

Université de Sherbrooke

**Implication des différents réservoirs calciques et
résistance aux agents cytostatiques par l'expression de la
P-glycoprotéine chez les lymphocytes Jurkat E.6.1**

par

Julie Martel

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)

Septembre 1993



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-93148-5

Canada

TABLE DES MATIERES	i
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
RESUME	xi
1. INTRODUCTION	1
1.1 Rôle du lymphocyte T dans la réponse immune	1
1.2 Activation des lymphocytes T	3
1.2.1 Définition	3
1.2.2 Activation via le complexe TCR/CD3	3
1.3 Substances capables d'activer le lymphocyte T	7
1.3.1 Les antigènes	7
1.3.2 Les lectines	7
1.3.3 Les anticorps monoclonaux	8
1.4 Evénements associés avec l'activation du lymphocyte T	9
1.4.1 Evénements associés avec la formation de diacylglycérol	11
1.4.2 Evénements associés avec la production d'inositol triphosphate	12
1.4.3 Protéines associées avec la mobilisation du calcium intracellulaire	13
1.4.3.1 Le récepteur à l'IP3	13
1.4.3.2 Le récepteur à la ryanodine	15
1.4.4 La mobilisation du calcium intracellulaire	18
1.4.5 Le phénomène d'oscillations de calcium intracellulaire	19
1.5 Modèles de réservoirs calciques lymphocytaires	20
1.5.1 Modèle à un réservoir calcique unique	20
1.5.2 Modèle à deux réservoirs calciques	23
1.6 Evénements tardifs reliés à l'activation du lymphocyte T	26
1.7 Activation du CD45	26
1.8 Le cycle cellulaire chez le lymphocyte T	27
1.8.1 Définition du cycle cellulaire	27

1.8.2	Régulation du cycle cellulaire	28
1.8.3	Synchronisation cellulaire	31
1.8.3.1	Le produit du gène MDR: la P-glycoprotéine	32
1.9	But du travail	36
2.	MATERIEL ET METHODES	38
2.1	Matériel	38
2.2	Méthodes	39
2.2.1	Culture cellulaire	39
2.2.2	Enumération des cellules et détermination de la viabilité cellulaire	39
2.2.3	Expériences de stimulation des lymphocytes pour les études de relâchement de calcium	40
2.2.4	Incubation des cellules Jurkat avec les diverses drogues	40
2.2.5	Essai d'incorporation de thymidine tritiée	41
2.2.6	Préparation des noyaux pour les études de cytofluorimétrie	41
2.2.6.1	Analyse des noyaux par cytofluorimétrie	42
2.2.7	Détermination spectrophotométrique et mesures de calcium intracellulaire	43
2.2.8	Préparation des cellules pour l'observation par microscopie électronique à balayage	44
2.2.9	Techniques utilisées pour la mise en évidence de la P-glycoprotéine	45
2.2.9.1	Isolement des plasmides	45
2.2.9.2	Isolement de la sonde MDR1 de foie humain	47
2.2.9.3	Radiomarquage de la sonde	48
2.2.9.4	Isolement de l'ARN total des cellules Jurkat E.6.1	48
2.2.9.5	Transfert de l'ARN sur membrane de nylon	50
2.2.9.6	Préhybridation et hybridation de la membrane	51
2.2.9.7	Lavage de la membrane	52

2.2.10	Etudes d'influx de la vinblastine	53
2.2.11	Etudes d'efflux de la vinblastine	53
2.2.12	Préparation des microsomes	54
2.2.13	Perméabilisation cellulaire	55
2.2.14	Mise en évidence du récepteur à la ryanodine	56
2.2.14.1	Essai d'isolement du récepteur à la ryanodine	56
2.2.14.2	Etudes de liaison de la ryanodine	57
2.2.14.3	Etudes d'analyse de type Western du récepteur à la ryanodine . . .	58
2.2.14.4	Analyses avec un anticorps anti-ryanodine	59
3.	RESULTATS	61
3.1	Synchronisation cellulaire	61
3.1.1	Etude d'incorporation de thymidine tritiée	61
3.1.2	Profil de distribution des lymphocytes Jurkat par analyse de cytofluorimétrie	64
3.1.2.1	Effets des drogues bloquant en phase G1/S	64
3.1.2.2	Effets des drogues bloquant en phase S	69
3.1.2.3	Effets des drogues bloquant en phase G2/M	72
3.1.3	Etude de la mobilisation du calcium chez des populations de lymphocytes Jurkat partiellement synchronisées	76
3.1.4	Microscopie électronique à balayage de cellules traitées à la colchicine	82
3.2	Mise en évidence de la P-glycoprotéine	86
3.2.1	Etudes d'influx et d'efflux de la vinblastine tritiée	87
3.2.2	Isolement du plasmide contenant le gène MDR	93
3.2.3	Isolement d'ARN des cellules Jurkat E.6.1	93
3.2.4	Analyse Northern	93
3.3	Etudes des divers réservoirs de calcium intracellulaire	95
3.3.1	Isolement des microsomes	96
3.3.2.	Perméabilisation cellulaire	99

3.3.3	Essai d'isolement du récepteur à la ryanodine	102
3.3.3.1	Essai de mise en évidence du récepteur non purifié	102
3.3.3.2	Essai de mise en évidence du récepteur purifié	102
3.3.3.3	Analyses de type Western	104
4.	DISCUSSION	105
4.1	La synchronisation cellulaire	105
4.2	Etude de mobilisation de calcium chez des populations de lymphocytes Jurkat partiellement synchronisées	109
4.3	Microscopie électronique à balayage	110
4.4	Mise en évidence de la P-glycoprotéine	113
4.5	Etudes d'influx et d'efflux de la vinblastine tritiée	116
4.6	Etudes des divers réservoirs de calcium chez les cellules Jurkat E.6.1	118
4.7	Mise en évidence du récepteur à la ryanodine chez les cellules Jurkat E.6.1	122
	REMERCIEMENTS	125
	REFERENCES	127
	ANNEXE	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Drogues utilisées et leur site d'action dans le cycle cellulaire	62
Tableau 2: Réponses calciques par des populations de cellules Jurkat partiellement synchronisées	80
Tableau 3: Etudes de liaison de la ryanodine tritiée à des fractions microsomales purifiées de lymphocytes Jurkat E.6.1	103

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de l'interaction du TCR/CD3 avec une molécule présentatrice d'antigène dans le contexte du CMH	4
Figure 2: Modèle du récepteur à l'IP3	14
Figure 3: Modèle du récepteur à la ryanodine	17
Figure 4: Modèle de la mobilisation du calcium impliquant un seul réservoir calcique	21
Figure 5: Modèle de la mobilisation du calcium impliquant deux réservoirs calciques	24
Figure 6: Représentation schématique de la régulation du cycle cellulaire par le MPF	30
Figure 7: Représentation schématique de la P-glycoprotéine	33
Figure 8: Incorporation de thymidine tritiée chez les cellules Jurkat E.6.1	63
Figure 9: Distribution cellulaire des lymphocytes Jurkat E.6.1	65
Figure 10: Pourcentage de la distribution de cellules Jurkat E.6.1 traitées à l'hydroxyurée, à la lovastatine et à la thymidine dans le cycle cellulaire	67

Figure 11: Pourcentage de la distribution de cellules Jurkat E.6.1 traitées à l'aphidicoline, à la cyclosporine A et à la rapamycine dans le cycle cellulaire	70
Figure 12: Pourcentage de la distribution de cellules Jurkat E.6.1 traitées à la colchicine, au taxol, à la cytochalasine B, à la vinblastine et au nocodazole dans le cycle cellulaire	73
Figure 13: Tracé montrant l'augmentation de calcium intracellulaire chez les cellules Jurkat E.6.1 <i>A)</i> non traitées et <i>B)</i> traitées à la colchicine suite à l'activation par la PHA	78
Figure 14: Etudes de microscopie électronique à balayage de cellules Jurkat E.6.1 traitées à la colchicine	83
Figure 15: Mesure d'influx de la vinblastine tritiée chez les cellules Jurkat E.6.1 en fonction du temps	88
Figure 16: Mesure d'efflux de la vinblastine tritiée chez les cellules Jurkat E.6.1 en fonction du temps	91
Figure 17: Résultats d'analyse Northern du gène MDR1 chez les cellules Jurkat E.6.1	94
Figure 18: Variation de la concentration de calcium cytosolique suite à la stimulation par l'IP3 chez des préparations de microsomes de cellules Jurkat E.6.1	97

Figure 19: Variation de la concentration de calcium cytosolique suite à la stimulation par l'IP3 chez des cellules Jurkat E.6.1 perméabilisées	100
---	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC: "ATP-Binding-Cassette"
ADNc: acide déoxyribonucléique complémentaire
ARN: acide ribonucléique
ATP: adénosine triphosphate
BAPTA: acide 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tétraacétique
BSA: albumine sérique bovine
CDC: "cell division cyclin"
CICR: " Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} -release"
CsA: cyclosporine A
DAG: 1,2-sn-diacylglycérol
DMSO: diméthyl sulfoxyde
DTT: D,L-dithiothréitol
EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA: acide éthylèneglycol-bis (β -aminoéthyl éther) N,N,N',N'-tétraacétique
FR: fraction
GAP: "GTP-associated protein"
GDP: guanosine diphosphate
GTP: guanosine triphosphate
Hepes: (N-(2-hydroxyethyl)pipérazine-N'-(2-acide éthanesulfonique))
IP3: D-*myo*-inositol 1,4,5-triphosphate
IP4: D-*myo*-inositol 1,3,4,5-triphosphate
MOPS: acide (3-(N-morpholino)propane-sulfonique)
MPF: "Maturation Promoting Factor"
PHA: phytohémmagglutinine de *Phaseolus vulgaris*
PKC: protéine kinase C
PLC: phospholipase C
PMSF: fluorure de méthanesulfonyle
RYR: récepteur à la ryanodine

SDS: sodium dodecyl sulfate

SSC: saline-sodium-citrate

STE: sodium-tris-EDTA

³H-thymidine: thymidine tritiée

TAE: tris-Acétate-EDTA

TCR: "T-cell receptor"

TE: tris-EDTA

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

RESUME

Plusieurs substances connues pour leur propriété d'induire l'arrêt du cycle cellulaire ont été utilisées afin de synchroniser les lymphocytes Jurkat E.6.1 dans le but d'étudier l'implication et l'importance des différentes phases du cycle dans le processus d'activation. Ces substances peuvent être regroupées selon leur site d'action: celles qui arrêtent les cellules en phase G1/S (hydroxyurée, lovastatine, thymidine), celles qui arrêtent les cellules en phase S précoce (aphidicoline, cyclosporine A, rapamycine) et celles qui arrêtent les cellules en phase G2/M (colchicine, cytochalasine B, nocodazole, taxol, vinblastine). Les analyses de cytofluorimétrie ont montré que les cellules Jurkat se distribuent à $45 \pm 7\%$ en phase G1, $43 \pm 8\%$ en phase S et $13 \pm 3\%$ en phase G2/M. Les résultats montrent qu'une synchronisation partielle est obtenue suite à l'utilisation des drogues. La distribution cellulaire est d'environ 25-40% en phase G1, 35-50% en phase S et 5-18% en phase G2/M lorsque l'hydroxyurée (100mM) et la lovastatine (100μM) sont utilisées. La thymidine n'a pas d'effet. Lorsque des drogues bloquant en phase S sont utilisées, seule l'aphidicoline (15μM) permet un enrichissement à 65% dans cette phase, diminuant à 30% la phase G1 sans changer la distribution de la phase G2/M. Par contre, l'utilisation de cyclosporine A (100nM) et de rapamycine (20nM) augmentent le pourcentage de cellule en phase G1 (60-70%) plutôt que la phase S (20-30%), ce qui a eu comme conséquence la diminution des cellules en phase G2/M (10% et moins). De leur côté, les agents destabilisateurs du cytosquelette ont enrichi la distribution cellulaire en phase G2/M (30-50%). Les études de calcium sur des populations partiellement synchronisées montrent l'implication importante du calcium dans les premières phases du cycle cellulaire.

L'effet de la colchicine (10μM) sur la morphologie cellulaire a été étudié par microscopie électronique à balayage. Seulement après 1 heure de traitement, les lymphocytes Jurkat E.6.1 subissent une désorganisation de la membrane plasmique, un phénomène absent chez les cellules Jurkat témoins. Cet effet est temporaire puisqu'après 24 heures de traitement avec la colchicine, les cellules retrouvent leur morphologie originale. L'impossibilité de synchroniser les lymphocytes Jurkat E.6.1 et les études de microscopie électronique, sous-entendent un mécanisme de résistance des lymphocytes Jurkat aux agents xénobiotiques. Nous avons alors émis l'hypothèse que la résistance soit due à l'expression d'une P-glycoprotéine, codée par les gènes MDR. Des études d'influx et d'efflux de vinblastine tritiée ont montré une cinétique appuyant l'hypothèse et des analyses de type Northern ont montré un ARN messager de 4.5kb, en accord avec la taille de l'ARN messager de la P-glycoprotéine.

L'augmentation de la concentration cytosolique de calcium est essentielle à l'activation des lymphocytes T. Cette augmentation est causée d'une part par le relâchement de calcium des réserves internes et d'autre part, par l'influx de calcium qui se fait probablement via des canaux calciques. Suite à des résultats préliminaires, nous avons émis l'hypothèse de la présence de deux réservoirs calciques impliqués dans la mobilisation du calcium chez les cellules Jurkat E.6.1. Les résultats obtenus suggèrent la présence de deux réservoirs calciques dont un est sensible à l'IP3 et l'autre sensible au calcium, à la caféine et à la ryanodine. Par contre, la relation fonctionnelle entre ces réservoirs n'a pu être établie. Suite à ces résultats, la mise en évidence d'un récepteur à la ryanodine a été tentée par des études de type Western mais sans succès.

1. INTRODUCTION

1.1 Rôle du lymphocyte T dans la réponse immune

Le système immunitaire est responsable de la défense d'un organisme contre l'invasion par des substances et envahisseurs étrangers tels les bactéries, les virus et les parasites. Il consiste en un grand réseau où la communication entre les organes et les tissus est assurée par la migration de différents types cellulaires. Ce trafic cellulaire se fait via le sang et la lymphe. Les cellules majeures du système immunitaire, les lymphocytes et les monocytes, sont produites dans les organes et les tissus du système réticulo-endothélial et interagissent avec des antigènes présents dans l'organisme. La synthèse d'anticorps (réponse humorale) a lieu dans les tissus du système immunitaire tandis que les réponses à médiation cellulaire peut avoir lieu n'importe où dans l'organisme.

Les lymphocytes sont les cellules dominantes du système immunitaire. On les retrouve principalement dans les ganglions, la rate, le thymus, la moelle osseuse et le sang. Il existe deux types de lymphocytes; les lymphocytes B et les lymphocytes T. Chez les oiseaux, l'ontogénie du lymphocyte B est bien connue. Les cellules souches débutent leur maturation dans un organe spécialisé, la bourse de Fabricius, où sous l'action d'hormones de maturation dont la bursopoiétine (Brand et coll., 1976), elles acquièrent les propriétés caractéristiques des cellules pré-B (Melchers et coll., 1989;

Rolink et Melchers, 1991). L'équivalent de la bourse de Fabricius chez les mammifères n'est pas connu. Il est généralement accepté que la maturation se produit initialement au niveau de la moelle osseuse, de là les lymphocytes migrent via le sang vers les organes lymphatiques et la lymphe. La transformation des lymphocytes pré-B en lymphocytes B et finalement en plasmocytes producteurs d'anticorps se fait par un mécanisme complexe impliquant les processus de réarrangement des gènes et d'exclusion allélique (Litman et coll., 1993; Malissen et coll., 1992; von Boehmer, 1992; Holliday, 1990).

La maturation du lymphocyte T suit un cheminement différent de celui du lymphocyte B. Les processus initiaux ont lieu dans le thymus et c'est dans cet organe qu'ont lieu les phénomènes de délétion clonale et la génération des lymphocytes T matures (Miller et Morahan, 1992). Ceux-ci acquièrent des marqueurs de surface caractéristiques et les propriétés fonctionnelles de chacune des grandes sous-populations de lymphocytes T: le lymphocyte T helper (Th) dont le rôle de soutien est essentiel dans la réponse immune, le lymphocyte T cytotoxique (Tc) qui est responsable de la lyse de cellules cancéreuses ou infectées et le lymphocyte T suppresseur (Ts) qui agit comme régulateur négatif de la réponse immune. Chacun de ces lymphocyte possède à sa surface des marqueurs qui lui sont propres. Ces marqueurs peuvent être décelés par des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface qu'on appelle CD ("cluster of differentiation"). Par exemple dans le thymus, les cellules immatures ou thymocytes expriment plusieurs marqueurs spécifiques dont le CD4 et le CD8. Au fur

et à mesure que les thymocytes se développent, ils vont exprimer l'un ou l'autre de ces marqueurs. Ces protéines de surface sont associées avec la fonction du lymphocyte T, le Th est CD4+ et les CTL et Ts sont CD8+ (Jorgensen et coll., 1992).

1.2 Activation des lymphocytes T

1.2.1 Définition

L'activation du lymphocyte T est le processus par lequel la reconnaissance d'un antigène par le complexe protéique TCR/CD3, dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), engendre la prolifération du lymphocyte, l'expression des fonctions caractéristiques des sous-populations T lymphocytaires et la production des cytokines.

1.2.2 Activation via le complexe TCR/CD3

Les lymphocytes T matures expriment à leur surface le complexe protéique TCR/CD3 dont le rôle est celui de reconnaître les antigènes qui ont été modifiés ("processed") et qui sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Kimball, 1990) (Figure 1). Cette reconnaissance implique une association multimoléculaire entre les composantes du TCR/CD3 et les protéines de surface des CPA, soient les protéines du CMH de classe I dans le cas des lymphocytes Tc et Ts,

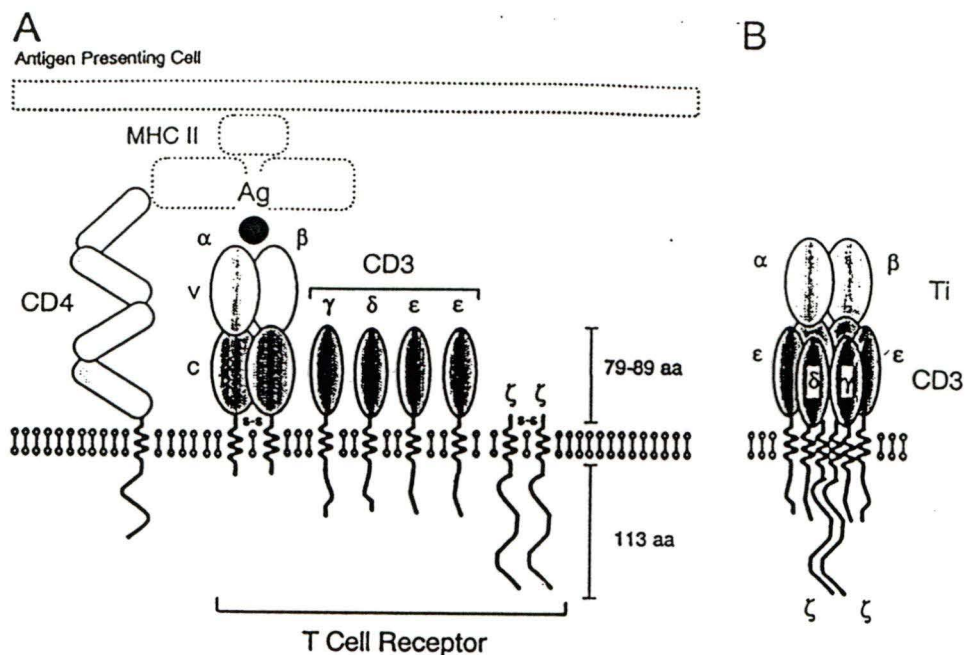


Figure 1: Représentation schématique de l'interaction du TCR/CD3 avec une molécule présentatrice d'antigène dans le contexte du CMH. *A* La région variable (V) de la chaîne α et β du TCR lie le peptide antigénique (Ag) présenté par le CMH de classe II présent sur la cellule présentatrice d'antigènes. La molécule accessoire CD4 interagit avec le CMH de classe II pour amplifier le signal. *B* Arrangement tridimensionnel possible du complexe TCR/CD3 favorisant l'association des domaines hydrophobes transmembranaires. Ti, T-idiotypique (Premack et Gardner, 1992).

soient celles du CMH de classe II dans le cas des lymphocytes Th (Kourilsky et Claverie, 1989; Bjorkman et Parham, 1990). D'autres molécules sont également impliquées dans le phénomène de reconnaissance, par exemple, l'antigène CD2 du lymphocyte T et son récepteur LFA3 (CD2) chez les CPA (Moingeon et coll., 1991).

Chaque lymphocyte T exprime 10^4 molécules du complexe TCR/CD3 à sa surface (Kimball, 1990). Le TCR est très polymorphe (4 chaînes s'organisant en hétérodimères α - β ou γ - δ) (Figure 1), ce qui lui permet de reconnaître et de lier un éventail de structures antigéniques présentées dans la contexte du CMH (Kronenberg et coll., 1986). L'hétérodimère γ - δ ne compte que pour 0,5 à 10% du récepteur présent chez les lymphocytes T du sang et son rôle est mal connu (Kimball, 1990). De son côté, l'hétérodimère α - β , lié par des liens disulfures, est la forme prédominante, non glycosylée, retrouvée du côté extracellulaire. De cette façon, l'hétérodimère forme une poche où l'interaction des peptides antigéniques avec le complexe TCR a lieu (Brown et coll., 1993; Matsumura et coll., 1992). Ce site de liaison varie d'un clone de lymphocyte T à l'autre du fait qu'il s'agit d'une région variable. La structure du site de liaison au peptide détermine la spécificité de l'antigène communément appelé l'idiotype. Pour cette raison, on réfère aussi aux chaînes α et β comme étant le Ti (T-idiotypic).

Le CD3 est composé de 5 polypeptides distincts (γ , δ , ϵ , ζ et η) (Figure 1) et est responsable d'induire la transduction du signal de par le fait que ces chaînes ont une

région cytoplasmique plus importante (45-55 acides aminés) que les chaînes composant le TCR (5-12 acides aminés). La masse moléculaire de ces composantes varie entre 16 et 28 KD. La stoechiométrie suggère qu'il y a une chaîne δ , une chaîne γ et deux chaînes non glycosylées ϵ . Ainsi, le TCR lié de façon non-covalente au CD3 avec la présence de deux autres chaînes ζ (ou ζ - η) non glycosylées et cytoplasmique (113 à 142 acides aminés) constitue le récepteur complet et fonctionnel du lymphocyte T (Letourneur et Klausner, 1992).

Il existe deux classes importantes de CMH: la classe I et la classe II. Les CMH chez l'humain sont désignés HLA ("human leukocyte antigen") et ils sont localisés sur le chromosome 6. Comme chez la souris (système H-2), les gènes encodent les molécules d'histocompatibilité de classe I et de classe II (Kimball, 1990).

Les CMH de classe I sont encodés par trois gènes, chacun codant pour une protéine membranaire glycosylée de 44 KD. Chacune de ces protéine est associée de façon non covalente avec la protéine invariante β 2-microglobuline (Kimball, 1990). L'importance de cette classe est dans la reconnaissance du soi et est exprimée à la surface de toutes les cellules de l'organisme.

Pour ce qui est de la classe II, les six gènes associés se retrouvent dans la région D du chromosome 6, dans laquelle on retrouve beaucoup de pseudogènes. Chacun des gènes encode soit une chaîne α (d'environ 34 KD) ou une chaîne β (d'environ 28

KD). Le CMH de classe II est formé d'une chaîne α et d'une chaîne β , liées de façon non covalente. L'expression du CMH de classe II se limite surtout aux lymphocytes B matures et aux macrophages activés. Le rôle de cette classe est l'induction de l'immunité humorale et cellulaire. En fait, certains antigènes protéolysés par les macrophages ne sont que partiellement dégradés. Ces fragments par la suite sont acheminés à la surface du macrophage, lié aux molécules CMH de classe II (Kimball, 1990). Ainsi les macrophages/monocytes et les lymphocytes B sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Lanzavecchia, 1988).

Il existe une autre classe, la classe III dont le rôle est important lors de l'activation du complément lors des réactions de lyse cellulaire (Kimball, 1990).

1.3 Substances capables d'activer le lymphocyte T

1.3.1 Les antigènes

La reconnaissance des antigènes par le lymphocyte T dans le cadre du CMH a été décrit à la section 1.2.2.

1.3.2 Les lectines

Les lectines sont des protéines capables de reconnaître, généralement de

manière spécifique, des glucides mono ou oligosaccharidiques liés ou libres à des glycoprotéines et des glycolipides (Brown et Hunt, 1978; Goldstein et Hayes, 1978; Goldstein et coll., 1980). Le mécanisme d'activation des lymphocytes T par les lectines ressemble probablement à celui de l'activation par un antigène, du moins en ce qui concerne les événements intracellulaires associés avec le phénomène (Tsien et coll., 1982; Dupuis et Bastin, 1988). Par contre, les molécules de la surface lymphocytaire qui sont impliquées dans la reconnaissance par les lectines demeurent mal définies. Dans le cas de la phytohémagglutinine A (PHA) de *Phaseolus vulgaris* ou de la concavaline A (ConA) de *Canavalia ensiformis*, deux activateurs spécifiques des lymphocytes T (Goldstein et Hayes, 1978), on croit que ces lectines lient les résidus d'hydrates de carbone présents sur les chaînes γ et δ de CD3 (Gardner et Premack, 1992).

Les sites récepteurs impliqués dans la reconnaissance par des lectines capables d'activer les lymphocytes T de manière spécifique (par rapport aux lymphocytes B) demeurent inconnus.

1.3.3 Les anticorps monoclonaux

La technique originale de Kohler et Milstein (1975) pour la production d'anticorps monoclonaux a été mise à profit pour générer des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes de la surface lymphocytaire T. Des anticorps (OKT3, Leu4,

UCHT1, etc) dirigés contre les composantes du complexe CD3 ou contre la partie clonotypique $\alpha\beta$ (C305) ou $\beta\gamma$ sont capables d'induire l'activation du lymphocyte T (Chan et coll., 1992). De plus, les anticorps dirigés contre CD2 (Bagnasco et coll., 1989; Meuer et coll., 1989; Moingeon et coll., 1991; Ley et coll., 1991), CD28 (June et coll., 1990) et CD45 (Yamada et coll., 1990; Samelson et coll., 1990; Trowbridge, 1991) provoquent l'activation du lymphocyte T et imitent en ce sens l'occupation du complexe TCR/CD3 par l'antigène-cellules CPA.

1.4 Événements associés avec l'activation du lymphocyte T

Lorsque le complexe TCR/CD3 reconnaît l'antigène présenté par le CMH de classe II, il s'en suit une panoplie d'événements à l'intérieur de la cellule. Les événements précoces sont des changements au niveau de la membrane plasmique, le changement de pH, le mouvement d'ions, la production d'IP3 et de ses dérivés, et l'élévation de calcium intracellulaire (Gelfand, 1990). A plus long terme, il y a expression de plusieurs gènes, production d'IL-2 et prolifération cellulaire (Crabtree, 1989).

Les événements précoces sont nombreux. En fait, les premières manifestations observées sont les mouvements d'ions et le changement de pH. Lors de l'activation, il y a une dépolarisation de la membrane ce qui cause une entrée d'ions dont celui détecté initialement est le Na^+ . De plus, suite à la stimulation, les canaux potassiques s'ouvrent

ce qui permet un efflux du potassium vers l'extérieur de la cellule. On remarque également une alcalinisation du milieu intracellulaire ce qui active les transporteurs Na^+/H^+ pour maintenir le pH normal (Gerson et coll., 1982; Gerson et Kiefer, 1983). Des études faites par Gelfand et collaborateurs (1984) sur les changements de potentiel membranaire et les études de Mills et collaborateurs (1986) sur les changements de pH intracellulaire montrent que ces deux événements ne sont cependant pas essentiels dans le processus d'activation des lymphocytes T.

Lors de l'interaction TCR/CD3-CMH, il est probable que les chaînes α et β du TCR soient impliquées dans l'interaction tandis que le CD3 (γ, δ, ϵ) et les chaînes ζ soient responsables de la traduction du signal et l'interaction avec les composantes cytoplasmiques. L'interaction du TCR avec le CMH est d'autant plus accentuée par la liaison du CD4 (Gardner et Premack, 1992) au complexe TCR/CD3. L'interaction TCR/CD3-CMH amène la phosphorylation de résidus tyrosines de plusieurs substrats intracellulaires et des chaînes ζ du complexe TCR/CD3 (Baniyash et coll., 1988; Bustelo et coll., 1992; Klausner et coll., 1987). Ceci a suggéré la présence de protéine kinases en amont de la PLC dans la cascade d'activation précédant la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). Les candidats probables sont des kinases associées au TCR qui sont en fait des produits de la famille src, les protooncogènes p59^{lyn} et p56^{lck} , fortement exprimés chez les lymphocytes (Strauss et Weiss, 1992). La p56^{lck} semble plutôt associée à CD4 et CD8 qu'au TCR directement et son action de phosphorylation est favorisée lors d'interactions impliquant le CD4 et

le lymphocyte Th (Gardner et Permack, 1992). La stimulation de TCR/CD3 amène l'association de p59^{lck} et p56^{lck} à la chaîne ζ ce qui a comme conséquence l'activation de PLC γ 1 par phosphorylation (Rhee, 1991). La PLC γ 1 hydrolyse le PIP2 en IP3 soluble et en DAG qui demeure associé à la membrane plasmique. Des études faites sur des mutants d'une lignée cellulaire Jurkat a montré qu'un épissage anormal de la protéine tyrosine lck, amenant une expression inadéquate de celle-ci, empêche l'augmentation de calcium intracellulaire suite à la stimulation lymphocytaire (Strauss et Weiss, 1992). Une fois l'expression de lck rétablie par transfection, les cellules répondent à la stimulation. De plus, des travaux de Appleby et collaborateurs (1992) ont montré que la protéine p59^{lck} participe dans la traduction du signal via le TCR. En fait, ils ont généré des souris transgéniques n'ayant pas l'isoforme de p59^{lck}. Ces souris ayant la mutation possèdent des lymphocytes T ne répondant pas aux stimulations par des antigènes via le TCR, tandis que les lymphocytes T périphériques répondent normalement suite à une maturation normale.

1.4.1 Événements associés avec la formation de diacylglycérol (DAG)

Le DAG demeure dans la membrane et sert de coactivateur, avec le calcium, au moins de certains isoenzymes de la protéine kinase C (PKC). La protéine kinase C est un enzyme ubiquitaire (Nishizuka, 1984) qui possède un domaine catalytique et un domaine régulateur (Inoue et coll., 1977). Les études de clonage ont montré l'existence de sept gènes codant pour huit isoenzymes de PKC soient α , β 1, β 2, γ

représentant la famille A des PKC et δ , ϵ , ζ et η représentant la famille B (Stabel et Parker, 1991). La différence majeure entre ces deux familles est que les isoenzymes composant la famille A ont un domaine catalytique C2 qui leurs permettent d'être régulés par le calcium, ce qui n'est pas le cas de la famille B. Lors de l'activation, la protéine kinase C cytosolique migre vers la membrane plasmique en réponse au diacylglycérol. La PKC phosphoryle plusieurs substrats cellulaires dont les chaînes δ , ϵ et ζ du CD3 et la protéine p21^{ras}. La protéine p21^{ras} est le produit d'un oncogène impliqué dans la formation d'une haute proportion des tumeurs humaines (Bourne et coll., 1991; Bourne et coll., 1990). Les oncogènes ras codent pour une famille de protéines de masse moléculaire de 21 KD qui lient le GTP. En présence de GTP, ces protéines sont actives et peuvent stimuler la croissance cellulaire. L'hydrolyse du GTP en GDP se fait par une composante de ras, lui étant associée, la protéine GAP (Downward et coll., 1990). La localisation de p21^{ras} dans la cascade d'activation du lymphocyte T n'est pas établie avec certitude mais des travaux récents de Baldari et collaborateurs (1993) ont suggéré qu'il pourrait se situer en amont de l'activation de la PKC.

1.4.2 Événements associés avec la production d'inositol triphosphate (IP3)

L'IP3 produit par l'activité de la phospholipase C est soluble et va se fixer à un récepteur spécifique présent au niveau du réticulum endoplasmique. L'occupation du récepteur à l'IP3 est l'événement initial impliqué dans la mobilisation du calcium intracellulaire chez le lymphocyte (Berridge, 1993).

1.4.3 Protéines associées avec la mobilisation du calcium intracellulaire

1.4.3.1 Le récepteur à l'IP3

Le récepteur IP3 a été caractérisé en 1979 sous le nom de protéine p400, isolée du cervelet de souris (Mikoshiba, 1993). Le clonage de P400 (Furuichi et coll., 1989) a montré que ce récepteur possède une région transmembranaire près du C-terminus avec une longue région N-terminale et de courtes régions C-terminales du côté cytoplasmique (Figure 2). De la drosophile à la souris comme chez l'humain, ce récepteur est très conservé (Mikoshiba, 1993). Les régions transmembranaires se dénombrent entre 4 ou 8 (Taylor et Richardson, 1991) ou 6 ou 8 (Mikoshiba, 1993) et sont probablement impliquées dans la formation du pore calcique. Les résultats d'expériences de réticulation (Maeba et coll., 1991) suggèrent que le récepteur existe sous forme tétramérique et est observable en microscopie électronique, où chaque sous-unité peut lier une molécule d'IP3. Le récepteur à l'IP3 est surtout exprimé au niveau du réticulum endoplasmique et il est présent dans les artères, les ovaires et dans l'utérus (Furuishi et coll., 1990). La fixation de l'IP3 amène l'ouverture du canal qui est maximale en présence de quatre molécules d'IP3 (Mikoshiba, 1993). Les différences entre diverses isoformes du récepteur à l'IP3 (I à IV) sont dues à l'existence de gènes séparés et à l'épissage alternatif, l'isoforme I étant prédominante (Furuichi et coll., 1989; Mignery et coll., 1990).

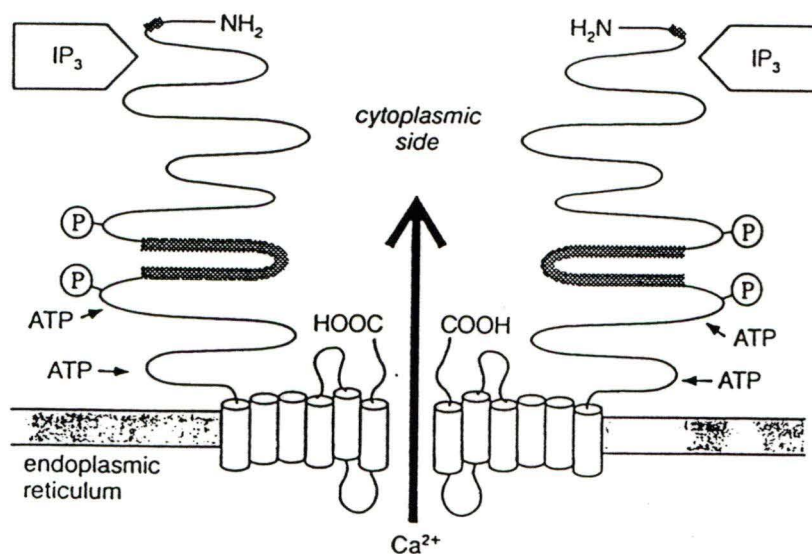


Figure 2: Modèle du récepteur à l'IP₃. Les sites ayant subi de l'épissage sont représentés en traits foncés. Les extrémités C- et N- terminales sont du côté cytoplasmique. P, sites de phosphorylation, ATP, sites de liaison de l'ATP, IP₃, sites de liaison de l'inositol 1,4,5-triphosphate (Mikoshiba, 1993).

1.4.3.2 Le récepteur à la ryanodine

La ryanodine est un alcaloïde isolé d'une plante d'Amérique de Sud, la *Ryania speciosa vahl*. Son premier intérêt était pour ses propriétés insecticides. Par la suite, on a constaté que cette substance, à des concentrations aussi faibles que 10^{-9} M, provoque la contraction presque irréversible du muscle squelettique des vertébrés (Jenden et coll., 1969). Des travaux subséquents ont permis d'établir que la ryanodine reconnaissait de manière spécifique une protéine intracellulaire définie opérationnellement comme étant le récepteur à la ryanodine. Le récepteur à la ryanodine, un canal calcique, est également responsable de la mobilisation du calcium et sa structure ressemble au récepteur à l'IP₃. En fait, il existe une grande homologie entre ces deux canaux laquelle vient de la région C-terminale et des quatre premières régions transmembranaires (Otsu et coll., 1990).

Le clonage du récepteur à la ryanodine a permis de mettre en évidence trois formes de récepteur, soit le RYR1 isolé du muscle squelettique de lapin et humain (retrouvé également dans le cerveau) (Takeshima et coll., 1989; Zorzato et coll., 1990), le RYR2 isolé du muscle cardiaque de lapin (retrouvé également dans le cerveau et l'estomac) (Otsu et coll., 1990) et RYR3 isolé des cellules de poumons de vison (retrouvé dans plusieurs tissus) (Giannini et coll., 1992) et du cerveau de lapin (Hakamata et coll., 1992). Les deux récepteurs isolés chez le lapin, la forme musculaire et celle cardiaque, possèdent 66% d'homologie mais le récepteur cardiaque possède une

plus grande affinité pour la ryanodine que le type musculaire. Le RYR3 possède 70% d'homologie avec RYR1 et RYR2 (Sorrentino et Volpe, 1993). Les études de structure montrent que le récepteur à la ryanodine possède quatre sous-unités de 500KD lui donnant l'allure d'un trèfle à quatre feuilles (Lai et coll., 1988). Chaque sous-unité possède 10 régions transmembranaires où l'homologie est à son plus faible entre les divers types du récepteur dans les régions transmembranaires 3, 4 et 5 (Sorrentino et Volpe, 1993). Il n'existe qu'un seul site de phosphorylation (Ser²⁸⁰⁹) présent sur le récepteur. La phosphorylation du récepteur à la ryanodine cardiaque, impliquant une kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante, active le canal calcique tandis que la phosphorylation du récepteur à la ryanodine squelettique provoque une inhibition du relâchement calcique. Une mutation en position Arg⁶¹⁵ (mutée en Cys) est responsable de l'hyperthermie maligne (MacLennan et Phillips, 1992) (Figure 3). La reconstitution de ce récepteur dans des bicouches lipidiques a montré une activité canal calcique intrinsèque (Lai et coll., 1988).

Le gène du récepteur à la ryanodine cardiaque humain se retrouve sur le chromosome 1 tandis que le récepteur à la ryanodine squelettique se retrouve sur le chromosome 19. Les seules différences que l'on retrouve entre ces deux récepteurs est que le récepteur cardiaque migre moins rapidement sur un gel d'acrylamide, ce qui laisse croire une masse moléculaire plus élevée. De plus, les épitopes antigéniques entre ces deux récepteurs sont distincts (Anderson et coll., 1989).

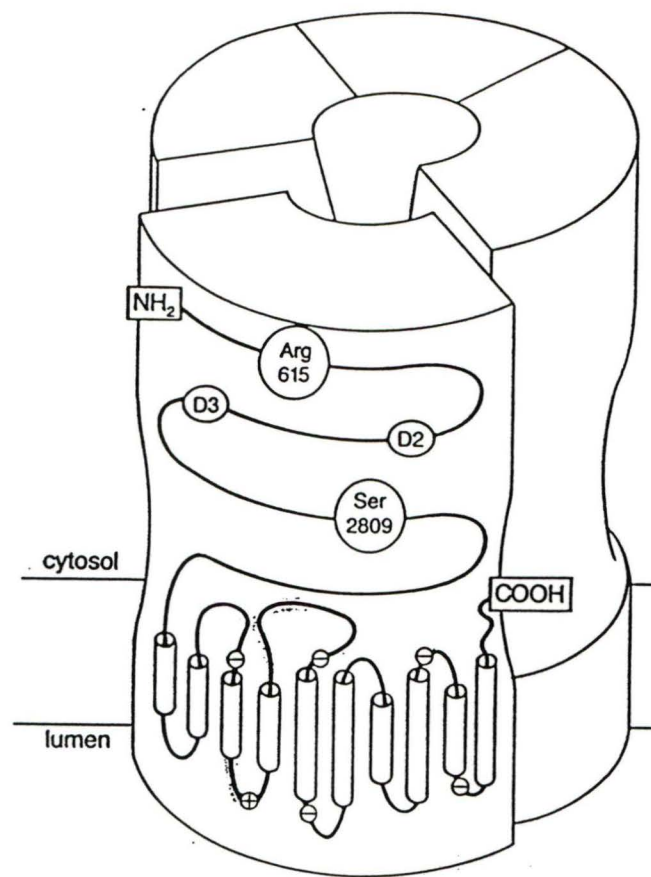


Figure 3: Modèle du récepteur à la ryanodine. Les extrémités C- et N- terminaux sont du côté cytoplasmique. Le canal fonctionnel a une structure tétramérique. L'Arg⁶¹⁵, mutée en Cys est responsable de l'hyperthermie maligne. La Ser²⁸⁰⁹ est le seul site de phosphorylation chez le type cardiaque du récepteur à la ryanodine. Dix régions transmembranaires sont représentées où les signes - et + réfèrent aux régions acides et basiques, respectivement (Sorrentino et Volpe, 1993).

1.4.4 La mobilisation du calcium intracellulaire

Les ions calcium sont des messagers secondaires importants lors de la transmission de signaux de la membrane plasmique à l'intérieur de la cellule (Tsien et coll., 1982). Une élévation de calcium cytosolique est observée suite à la stimulation du lymphocyte T par des anticorps ou des lectines (Bastin et coll., 1990; Tsien et coll., 1982; Imboden et Weiss, 1988). La phase initiale observée est le résultat de la production d'IP3 qui fait relâcher du calcium à partir des réservoirs intracellulaires du réticulum endoplasmique (Imboden et Weiss, 1987). Cette phase initiale est suivie d'une phase soutenue de calcium résultant d'un influx de calcium impliquant probablement des canaux calciques et semble plus importante en comparaison au relâchement du calcium interne (Gelfand et coll., 1988). L'influx de calcium est une composante essentielle de l'activation lymphocytaire puisqu'en absence de Ca^{2+} externe, on ne peut observer l'activation des lymphocytes T et la production d'IL-2 (Imboden et coll., 1987).

La nature des composantes membranaires impliquées dans l'influx de calcium chez le lymphocyte T demeure incertaine. Des études de patch clamp ont suggéré la présence de canaux calciques voltage-dépendant (Dupuis et coll., 1989; Densmore et coll., 1992), tandis que d'autres auteurs ont suggéré la présence d'une conductance calcique (Lewis et Cahalan, 1989) et l'absence de canaux calcique voltage-dépendant (Premack et Gardner, 1992). Il a été proposé que l'IP3 et l'IP4 pourraient être impliqués dans l'entrée du calcium (Irvine, 1991).

Le calcium mobilisé à partir des réserves a trois options: être repompé dans les réservoirs, agir comme activateur ou interagir avec des protéines. S'il est repompé, ceci se fait via des Ca^{2+} -ATPases présentes au niveau du réticulum endoplasmique (Bigelow et Inesi, 1992) ou à la surface de la membrane plasmique (Wuytack et Raeymaekers, 1992; Carafoli, 1991). Il peut également servir d'activateur de la MAP II kinase (Chao et coll., 1992) responsable de l'activation des facteurs de transcription de l'ADN ou interagir avec des protéines telles les calmodulines pour permettre la régulation des canaux ioniques (Premack et Gardner, 1992).

1.4.5 Le phénomène d'oscillations de calcium intracellulaire

L'augmentation de calcium intracellulaire chez une population de lymphocytes T activés représente la somme de variations individuelles de calcium intracellulaire (Lewis et Cahalan, 1989). L'étude de la variation de calcium intracellulaire chez des lymphocytes T individuels a montré un patron différent de celui observé dans le cas de population lymphocytaires. Par exemple, Payet et collaborateurs (1991) ont rapporté que chez le lymphocyte T Jurkat, on peut observer divers profils de fluctuations de calcium intracellulaire qui se manifestent spontanément en absence de stimulus. L'addition d'un agent activateur tel que la PHA induit une modification de ces profils (Lewis et Cahalan, 1989; Payet et coll., 1991). Les mécanismes qui sont impliqués dans la génération de variations de calcium intracellulaire (oscillations et "spikes") ne sont pas encore élucidés. Plusieurs modèles ont été proposés et ceux-ci peuvent être regroupés sous

deux types; le modèle de la régulation par le récepteur et celui de la régulation par le calcium. Le premier modèle suggère la présence d'un réservoir calcique unique tandis que le deuxième propose une interaction entre deux réservoirs calciques ou d'un seul réservoir capable d'être activé de deux façons différentes (Tsien et Tsien, 1990; Berridge, 1991; Meyer et Stryer, 1991; Dupont et coll., 1991).

1.5 Modèles de réservoirs calciques lymphocytaires

1.5.1 Modèle à un réservoir calcique unique - Régulation dépendante du récepteur

Ce modèle, proposé par Cobbold et collaborateurs (1989) et par Meyer et Stryer (1988), suggère l'existence d'un seul réservoir de calcium à l'intérieur de la cellule (Figure 4). Dans ce modèle, suite à la reconnaissance d'un antigène via le complexe TCR/CD3, la phospholipase C est activée, ce qui permet l'hydrolyse des phosphatidylinositols en diacylglycérol et en IP3. L'IP3 se fixe à son récepteur et induit la libération du calcium à partir des réservoirs sensibles à l'IP3. Le calcium libéré peut être repompé dans les réservoirs intracellulaires, peut interagir avec des protéines cellulaires telles les calmodulines et stimuler, en combinaison avec le diacylglycérol, les isoenzymes de la PKC qui sont Ca^{2+} -dépendantes.

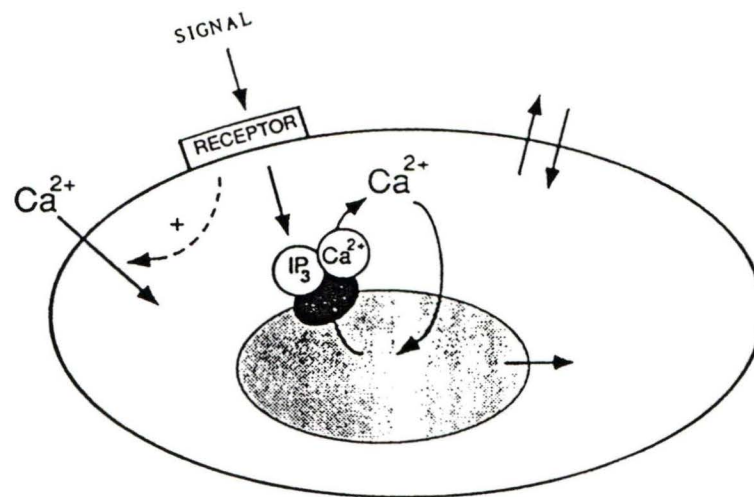


Figure 4: Modèle de la mobilisation du calcium impliquant un seul réservoir calcique.

Ce modèle sous-entend qu'un seul canal calcique est activé par l'IP₃ et par le Ca²⁺, tout deux agissant comme agonistes (Dupont et Goldbetter, 1993).

Ce modèle tient compte du fait que l'IP₃, en concentration variante, est nécessaire à la libération du calcium (Isakov et coll., 1986). Suivant ce modèle, une fluctuation de l'IP₃ intracellulaire est responsable de la libération initiale de calcium intracellulaire, donc de la génération de la phase initiale du phénomène oscillatoire. L'hydrolyse de l'IP₃ ou une modulation négative de l'activité de la PLC γ 1 par la PKC ou la PKA (Park et coll., 1992) couplée à l'activité des Ca²⁺-ATPases (cytosoliques et membranaires) amène une décroissance rapide de calcium intracellulaire. Le phénomène est répété par l'activation de la PLC γ 1 par le biais de protéines kinases (Meyer et Stryer, 1988). En somme, le modèle ICC ("IP₃-Ca²⁺ crosscoupling") fonctionne par le biais d'un contrôle positif rétroactif par l'IP₃. Le modèle est illustré à la figure 4. Ce modèle a également été proposé par Swann et Whitaker (1986) dans leurs études sur des ovocytes de *Xenopus laevis*.

Le modèle de Meyer et Stryer n'est peut être pas applicable chez toutes les cellules. En effet, l'utilisation de dérivés faiblement hydrolysables de l'IP₃ microinjectés chez l'ovocyte de *Xenopus laevis* induit un phénomène de calcium oscillatoire (Wakui et coll., 1989) qui semble indépendant des fluctuations de l'IP₃ intracellulaire.

1.5.2 Modèle à deux réservoirs calciques - Régulation par le calcium

Goldbeter et coll. (1990) ont proposé un modèle basé sur l'existence de deux réservoirs de calcium. Un réservoir sensible, répondant à l'IP3 qui contribue avec l'entrée de calcium à la concentration cytosolique et un autre réservoir, insensible à l'IP3, répondant à la concentration de calcium cytosolique. Par analogie au système musculaire, ce deuxième réservoir serait responsable des phénomènes oscillatoires, appelé " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release" (CICR) (Figure 5). Ce phénomène s'observe lorsqu'un seuil de calcium intracellulaire est atteint (relâchement interne combiné à l'influx) et ceci amène un relâchement explosif de calcium des réservoirs sensibles au calcium. Ce phénomène rétroactif où le calcium engendre son propre relâchement est une propriété des récepteurs à la ryanodine et peut avoir lieu dans des cellules non musculaires exprimant le récepteur. Le modèle assume que la concentration de calcium dans le réservoir sensible à l'IP3 reste constante, ce qui suggère un remplissage rapide impliquant l'activation de l'entrée de calcium externe proposé par Berridge (1990) et Putney (1986). Le calcium cytosolique est pompé dans un compartiment insensible à l'IP3 et peut être relâché dans un processus activé par le calcium cytosolique. Suivant ce modèle, une baisse rapide de calcium intracellulaire devrait engendrer un arrêt des oscillations de calcium. Ceci a été observé chez le lymphocyte Jurkat par addition d'EGTA dans le milieu d'incubation (Payet et coll, 1991).

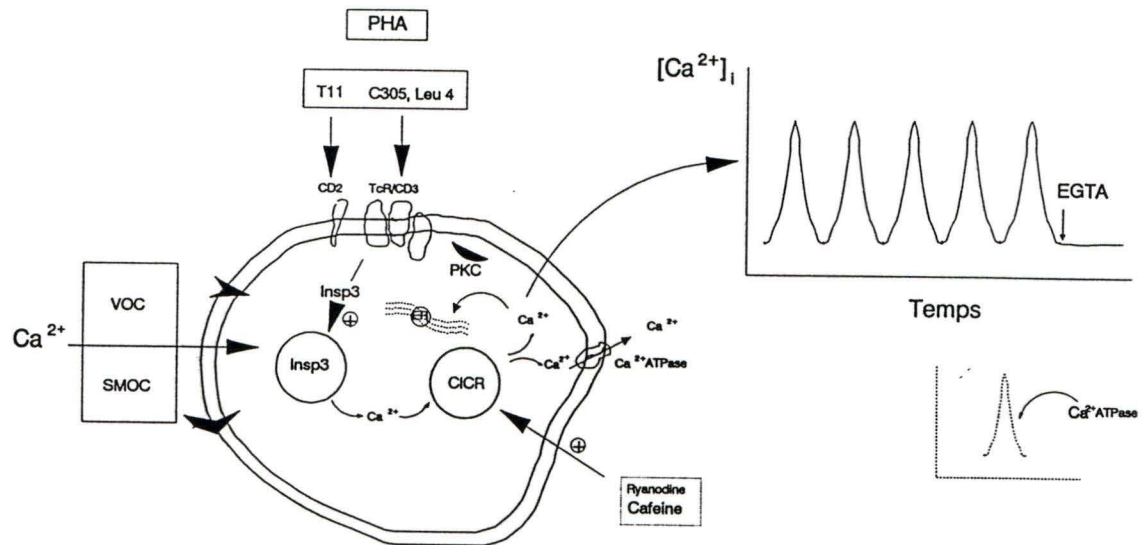


Figure 5: Modèle de la mobilisation du calcium impliquant deux réservoirs calciques. Ce modèle suppose la présence d'un réservoir sensible à l'IP3 et un autre sensible au Ca^{2+} , à la ryanodine et à la caféine. Ce deuxième réservoir serait à la source du phénomène CICR. L'activation de ces réservoirs peut se faire par une interaction TCR/CD3, ou via le CD2. L'entrée du calcium dans la cellule peut se faire par des canaux voltage-dépendant (VOC) ou par des canaux opérés par seconds messagers (SMOC). Le phénomène CICR engendre des oscillations de calcium qui sont abolies par l'addition d'EGTA.

Le modèle CICR n'est pas considéré physiologiquement important dans le muscle squelettique, mais il est très important dans le muscle cardiaque (Fabiato, 1983) et dans le muscle lisse (Iino, 1989). Un mécanisme CICR a été observé chez des cellules non musculaires telles, en autres, les neurones (Neering et McBurney, 1984), les cellules chromaffines de la surrénale (Malgaroli et coll., 1990), les hépatocytes (Rooney et coll., 1991), les cellules sécrétant l'insuline (Shahidul Islam et coll., 1992), les cellules chromaffines de rat (Malgaroli et Meldolesi, 1991) et de boeuf (Burgoyne et coll., 1989), les cellules pancréatiques (Opsichuk et coll., 1990), les neurones sympathiques (Kuba, 1981), les oeufs de hamster (Igusa et Miyazaki, 1983), les ovocytes de souris (Peres, 1990) et de *Xénopus laevis* (Berridge, 1988), et le muscle lisse (Kanaide et coll., 1987).

Récemment, Dupont et Goldbeter (1993) ont proposé une variante du modèle à deux réservoirs où le même réservoir calcique pourrait présenter des sensibilités différentes à l'IP3 et au calcium.

Par des études en microspectrofluorimétrie, on a constaté que la caféine pouvait induire des oscillations de calcium chez des lymphocytes T Jurkat E.6.1 (Ricard et coll., non publié). On a également montré l'existence d'un réservoir calcique sensible à la caféine chez des cellules perméabilisées (Martel et coll., non publié). Ces résultats suggèrent que le lymphocyte Jurkat possède un réservoir calcium dont les propriétés ressemblent au réservoir sensible à la ryanodine. Des résultats semblables ont été obtenus par l'utilisation de ryanodine (Ricard et coll., non publié).

1.6 Evénements tardifs reliés à l'activation du lymphocyte T

La conséquence à long terme de l'activation des lymphocytes T est l'expression de gènes associés avec la réponse immune. Il y a plus de 70 protéines qui sont exprimées suite à l'activation lymphocytaire (Crabtree, 1989). Ces gènes peuvent être divisés en gènes immédiats, précoces et tardifs suivant leur temps d'expression après la liaison du ligand à son récepteur.

Les proto-oncogènes *c-fos* et *c-myc* sont des gènes immédiats car ils s'expriment 15-30 minutes après la stimulation. Les gènes précoces prennent de 30 minutes à 6 heures à s'exprimer comme c'est le cas de l'IL-2 et l'interféron γ . Parmi les gènes tardifs qui s'expriment après 48 heures, on retrouve ceux qui codent pour la protéine HLA-DR (Crabtree, 1989).

1.7 Activation du CD45

L'activation du CD45 est également un événement associé à la stimulation lymphocytaire (Janeway, 1992). Il est clair que le complexe TCR/CD3 et le CD4, ou le CD8, fonctionnent comme traducteur du signal et que le tout est modulé par la principale tyrosine phosphatase, le CD45 (Gallagher et Cambier, 1990). Le CD45 fait partie d'une famille de glycoprotéines de surface cellulaire d'environ 180 à 220KD exprimées à la surface cellulaire des lymphocytes et d'autres cellules hématopoïétiques

(Yamada et coll., 1990). Les huit isoformes possibles de CD45 sont générés par épissage alternatif de trois exons au niveau des ARN messagers (Saga et coll., 1990). Le CD45 est essentiel pour la réponse proliférative des cellules T. Des cellules Th et Tc négatives pour le CD45 ne peuvent répondre à l'antigène (Pingel et Thomas, 1989). Le rôle probable de CD45 est de promouvoir un signal positif nécessaire à la prolifération (Fisher et coll., 1991). Le mécanisme par lequel CD45 module la réponse antigénique est par la déphosphorylation de résidus tyrosines sur un ou plusieurs substrats demeure encore inconnu. Des expériences de coprécipitation au moyen d'anticorps anti CD45 et anti CD4 ont montré que le CD45 induit la déphosphorylation de p56^{lck}, ce qui suggère que le CD45 peut agir sur la p56^{lck} *in vivo* (Ostergaard et Trowbridge, 1990).

1.8 Le cycle cellulaire chez le lymphocyte T

1.8.1 Définition du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le phénomène par lequel une cellule passe de la phase quiescente, G0, pour entrer en phase G1 du cycle cellulaire. Il s'en suit la prolifération cellulaire à travers les autres étapes soient S, G2 et M (Darnell et coll., 1986).

La phase G1, ou gap 1, est l'étape précédant la phase S où il y a duplication du matériel génétique; cette étape est la plus longue du cycle cellulaire. Par la suite, la

cellule entre en phase G2, ou gap2, où l'on retrouve les étapes précédant la mitose qui comprend l'interphase, la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Darnell et coll., 1986). La durée de ces différentes phases dépend du type cellulaire et les conditions de croissance. Les cellules Jurkat ont un cycle d'environ 17 heures (Aoudjit, 1990).

1.8.2 Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des mammifères comporte une série d'événements séquentiels hautement régulés. Quand les études sur le cycle cellulaire ont débuté, on pensait que seulement deux phases étaient impliquées: l'interphase et la mitose. Ce phénomène semblait bien contrôlé. D'autres coordinations importantes semblaient cependant exister comme le fait qu'une cellule n'entre pas en mitose tant et aussi longtemps que les chromosomes ne sont pas répliqués. C'est suite à l'étude des ovocytes de *Xenopus laevis* que l'on a pu mettre en évidence la présence d'un facteur appelé "Maturation Promoting Factor" (MPF) qui permettait à l'ovocyte immature de se diviser par injection de MPF. La composition du MPF était incertaine jusqu'à ce que le groupe de Masui isole le facteur et démontre son implication régulatrice dans le cycle cellulaire (Masui, 1992). Le MPF est très conservé (levure, invertébrés marins et mammifères).

Par la suite, on a constaté qu'à des temps périodiques, un oeuf de grenouille présentait des contractions, ce qui présupposait une différence d'activité dans le cycle.

Cette oscillation autonome est en fait sous la régulation de l'activité de MPF, laquelle elle même fluctue. De fait, l'activité MPF est présente durant la mitose mais disparaît à l'interphase. L'une des composantes responsable de la fluctuation de l'activité MPF est une famille de protéines, les cdc, qui possèdent une activité protéine kinase et dont l'activité n'est pas continue durant le cycle cellulaire (Norbury et Nurse, 1992). L'activité cdc-2 est essentielle à la division cellulaire puisque des mutations de cdc-2 entraînent une inhibition de la mitose (Cyert et Kirschner, 1988). Le cdc-2 permet l'entrée en mitose et fait partie du MPF. Même si leur activité fluctue durant le cycle cellulaire, on a constaté que les cdc-2 étaient en concentration constante durant le cycle. Ces résultats ont suggéré que l'activité cdc-2 était régulée par la présence de d'autres facteurs, composant le MPF, qui active ou inactive le MPF. Ces facteurs, les cyclines, sont produits à un rythme constant, dont la vitesse d'accumulation et de dégradation régule le MPF. La dégradation des cyclines est essentielle pour que la mitose soit complète. Une inhibition de la dégradation arrête les cellules en mitose (Cyert et Kirschner, 1988).

D'autres facteurs comme le cdc-25 et le cdc-28 sont également très importants pour le passage en mitose (Reed, 1992). La figure 6 montre comment les composantes de MPF interagissent entre elles pour donner un complexe MPF mature et par le fait même, permettent le cycle cellulaire.

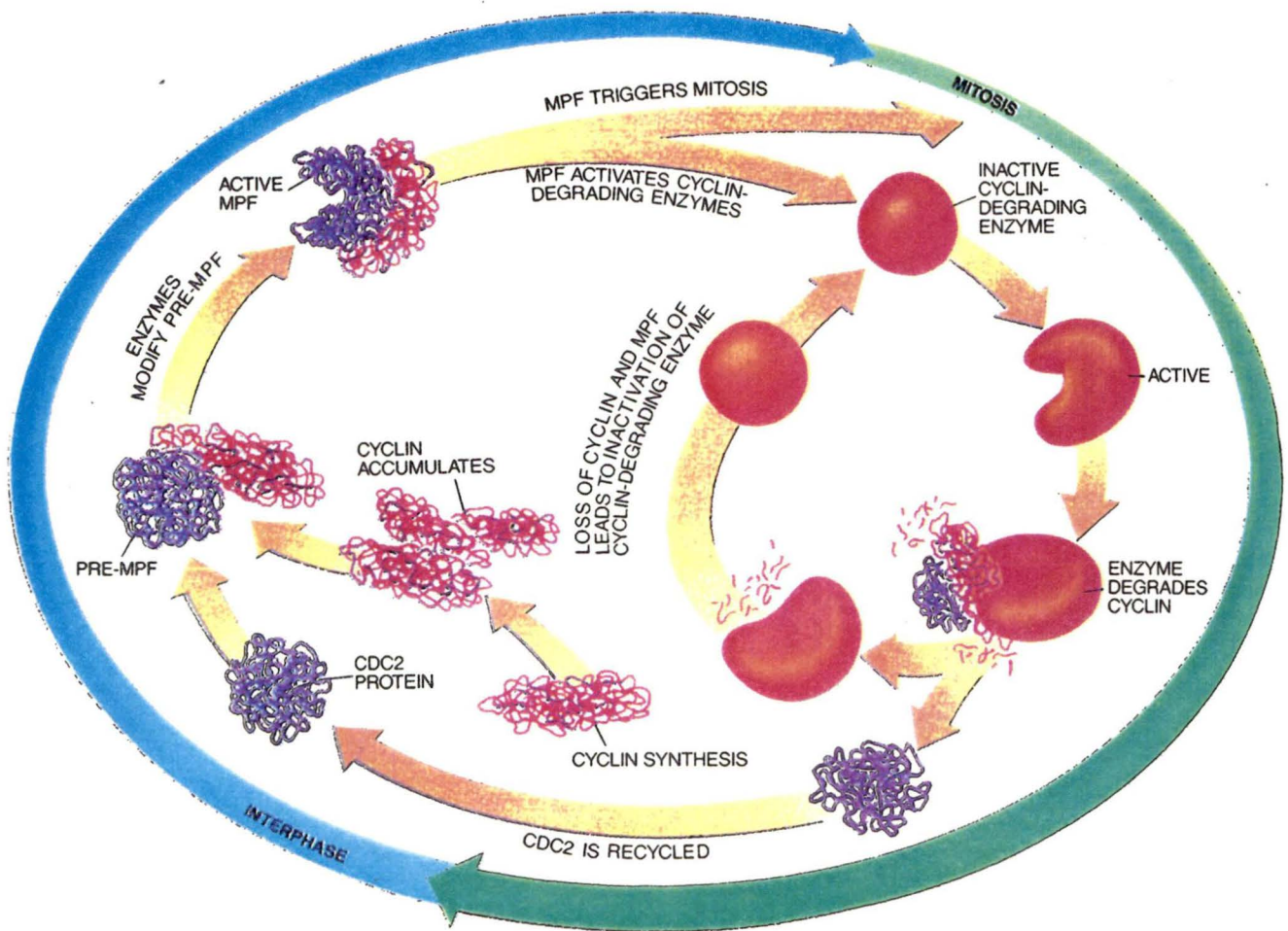


Figure 6: Représentation schématique de la régulation du cycle cellulaire par le MPF. La cycline s'accumule durant l'interphase et s'associe avec la cdc-2 pour former le pré-MPF, inactif. Ensuite, des protéases convertissent le complexe pré-MPF en MPF actif ce qui amène à la mitose et active l'enzyme qui dégrade la cycline. Au fur et à mesure que la cycline est dégradée, le MPF devient inactif ainsi que l'enzyme qui dégrade la cycline. De cette façon, la cycline peut s'accumuler à nouveau et le cycle recommence (Murray et Kirschner, 1991).

1.8.3 Synchronisation cellulaire

La synchronisation cellulaire est l'événement qui permet, par le biais de différentes techniques, de faire en sorte que les cellules se divisent de manière synchrone. Plusieurs substances sont connues pour arrêter les cellules à différents stades du cycle. Ces inhibiteurs peuvent être regroupés en deux catégories: ceux qui agissent durant la phase de mitose et ceux qui agissent ailleurs dans le cycle. Par exemple, toute drogue qui empêche l'organisation normal du cytosquelette comme le taxol (Allan et Vale, 1991), les déstabilisateurs des microtubules comme la colchicine et le nocodazole (Roberts et Hyams, 1979; Dustin, 1984) et les déstabilisateurs des microfilaments comme la vinblastine et la cytochalasine B (Darnell et coll., 1986) vont empêcher la migration des chromosomes au pôle de la cellule durant la mitose. L'arrêt du cycle peut également être obtenu en utilisant des drogues qui agissent au niveau du passage G1/S comme l'hydroxyurée et la thymidine, des inhibiteurs de la ribonucléotide réductase (Vincent et coll., 1982) et la lovastatine, un inhibiteur de la HMGCoA réductase (Vincent et coll., 1991). D'autres substances comme l'aphidicoline, un inhibiteur de l'ADN polymérase α (Nasheuer et coll., 1991) et les immunosuppresseurs tels la cyclosporine A et FK506 (Schreiber et Crabtree, 1992) et la rapamycine, un inhibiteur de la S6 kinase (Price et coll., 1992) amènent l'arrêt du cycle quelque peu après l'entrée en phase S.

Les drogues mentionnées ci-haut peuvent permettre la synchronisation cellulaire

in vitro et sont utilisées comme moyen de traitement de chimiothérapie. Cependant, l'utilisation clinique de ces drogues peut induire une résistance chez des patients et ceci est un obstacle majeur dans le traitement. Plusieurs mécanismes de résistance aux agents chimiothérapeutiques sont connus (Hayes et Wolf, 1990). Un de ces mécanismes est l'expression du gène MDR ("Multiple Drug Resistance") (Ling, 1992).

1.8.3.1 Le produit du gène MDR: la P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine, issue de l'expression du gène MDR, est une protéine de transport multiple énergie-dépendante (Figure 7). Des travaux de Juliano et Ling (1976) ont montré que la résistance à la colchicine chez des cellules CHO était en relation directe avec l'expression d'une protéine de 170 KD appelée P-glycoprotéine. Ces observations, avec les phénotypes MDR observés dans différents cas, suggèrent que la P-glycoprotéine joue le rôle d'un transporteur qui expulse, de façon non spécifique, toute drogue vers l'extérieur de la cellule (Hayes et Wolf, 1990). L'utilisation de réactifs photoactivables dérivés de la vinblastine a montré que la P-glycoprotéine lie les drogues à des sites spécifiques (Cornwell et coll., 1986). De plus, la P-glycoprotéine possède deux sites de fixation de l'ATP et montre une activité ATPasique (Cornwell et coll., 1987; Hamada et Tsuruo, 1988). La séquence primaire révèle que cette protéine possède beaucoup d'homologie avec des protéines impliquées dans le transport membranaire bactérien (Gros et coll., 1986). En fait, la P-glycoprotéine fait partie de la superfamille des ABC proteins ("ATP Binding Cassette") dans laquelle

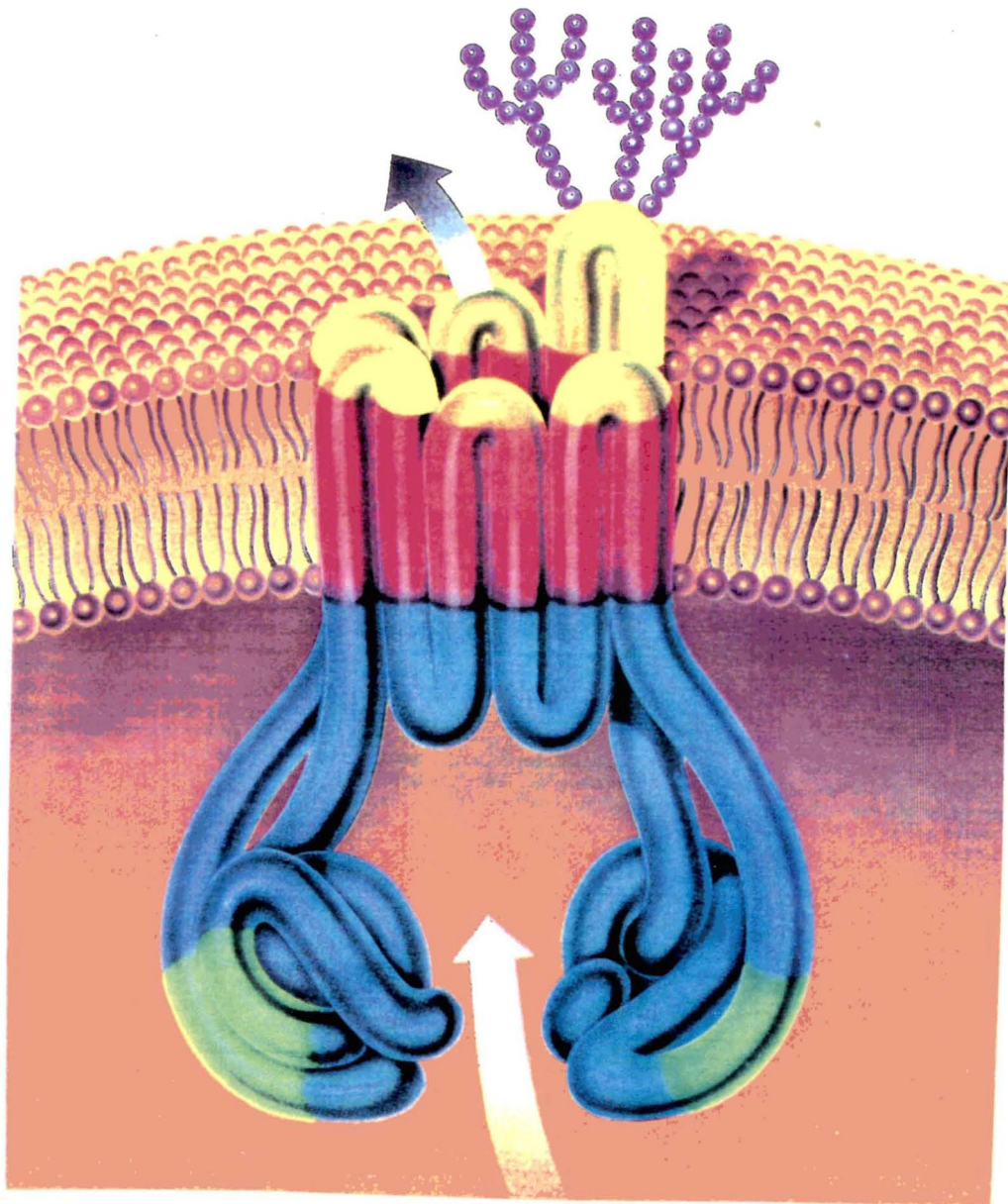


Figure 7: Représentation schématique de la P-glycoprotéine. La P-glycoprotéine est composée de 12 régions transmembranaires (rouge) formant ainsi un pore par où les drogues pourraient être expulsées. La partie externe de la protéine a un site où se fixe une chaîne glycosylée (violet). La partie intracellulaire possède des régions où se fixent l'ATP (vert) et les flèches indiquent le mouvement d'efflux (Kartner et Ling, 1989).

on retrouve en outre le "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (Riordan et coll., 1989), une protéine impliquée dans la fonction musculaire, dont les mutations sont responsables de la fibrose kystique, et les protéines de transport impliquées dans la présentation des épitopes antigéniques (Townsend, 1992).

Les P-glycoprotéines sont codées par une famille de gènes; deux gènes humains, trois gènes murins, trois gènes bovins et cinq gènes porcins (Gottesman et Pastan, 1988; Endicott et Ling, 1989; van der Bliek et Borst, 1989). La P-glycoprotéine est exprimée dans plusieurs tissus normaux; reins, estomac, foie, intestin, colon et rate. En fait, on la retrouve dans tout tissu qui possède une fonction de détoxification ou de sécrétion. Elle est également exprimée dans les glandes surrénales humaines (cortex) où l'on note une activité de biosynthèse de stéroïdes (Sugawara et coll., 1988).

Une analyse d'hydrophobicité de la P-glycoprotéine suggère que la protéine possède 12 régions transmembranaires (Gros et coll., 1986). Ces 12 régions transmembranaires forment un pore dans la membrane par lequel les drogues seraient expulsées (Figure 7) (Henderson et Maiden, 1987).

L'expression de la P-glycoprotéine est en partie responsable de la résistance que développent les patients soumis à la chimiothérapie (Cole, 1992). L'évidence vient du fait d'essais cliniques où l'utilisation d'un inhibiteur de la P-glycoprotéine, le vérapamil, conduit de nouveau à la sensibilité au traitement par des substances

chimiothérapeutiques (Chabner et Fojo, 1989).

1.9 But du travail

L'augmentation du calcium intracellulaire est l'événement essentiel associé avec la traduction du signal chez les lymphocytes T.

Le travail présenté ici s'inscrit dans le cadre des divers événements observés suite à l'activation des lymphocytes T Jurkat et vise à répondre aux questions suivantes:

A) Quelle est la spécificité des diverses phases du cycle cellulaire chez les lymphocytes T Jurkat E.6.1 en terme de la réponse calcique ?

B) Quelles sont les diverses réserves de calcium présents chez les Jurkat E.6.1.?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié...

A1) La capacité de diverses drogues à induire la synchronisation des lymphocytes Jurkat E.6.1.

A2) La distribution des lymphocytes Jurkat E.6.1 dans les diverses phases du cycle cellulaire par études d'incorporation de thymidine tritiée et par études de cytofluorimétrie.

A3) Les changements morphologiques induits par la colchicine (microscopie électronique).

A4) L'efflux et l'influx de vinblastine tritiée via la P-glycoprotéine.

A5) La présence de la P-glycoprotéine et de son message.

B1) Les effets de la ryanodine et de la caféine sur la relâche de calcium à partir de préparations de microsomes et de lymphocytes perméabilisés.

B2) La mise en évidence du récepteur à la ryanodine chez les lymphocytes Jurkat
E.6.1.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel

Les produits suivants: BSA, pénicilline, streptomycine, colchicine, vinblastine, hydroxyurée, taxol, cytochalasine B, nocodazole, lovastatine, aphidicoline, thymidine, rapamycine, spermine, spermidine, RNase, anti-IgG de lapin-biotine, streptavidine peroxydase, vérapamil, saponine et héparine-agarose proviennent de la compagnie Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO).

Le milieu de culture RPMI 1640 et le sérum FBS ont été achetés des laboratoires Flow (Montréal). Les produits radioactifs, la ^3H -vinblastine et la ^3H -ryanodine, ont été achetés de la compagnie Amersham (Montréal). La PHA a été préparée dans nos laboratoires (Dupuis et Bastin, 1988).

La gentamicine a été obtenue de Schering Canada Inc. (Pointe-Claire, Québec). La cyclosporine A est un don du Dr. L. Zollinger-Beauregard (Sandoz, Dorval). Le bleu de Trypan a été acheté de la compagnie Grand Island Biological (Grand Island, NY). Le fura2-AM, le fura2 et le quin2 proviennent de la compagnie Calbiochem Corporation (San Diego, CA). Les enzymes de restriction proviennent de la compagnie Pharmacia (Montréal).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Les lymphocytes T utilisés pour nos études sont des lymphocytes T Jurkat E.6.1 provenant du laboratoire du Dr. A. Weiss (Howard Hughes Institute, département de médecine, Université de Californie à San Francisco).

Les lymphocytes T ont été maintenus dans du milieu RPMI 1640 contenant de la pénicilline (100 unités/ml), de la streptomycine (100 μ g/ml) et de la garamycine (40ng/ml). Le milieu a été supplémenté avec 10% (v/v) de sérum FBS inactivé par la chaleur (56°C pendant 30 minutes). Les cellules ont subi un passage à tous les quatre jours et ont été utilisées au jour 2 et 3 du passage.

2.2.2 Enumération des cellules et détermination de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules a été déterminée par la technique d'exclusion au bleu de Trypan en utilisant le protocole suivant: une aliquote de la suspension cellulaire est prélevée puis diluée avec une solution de bleu de Trypan 0.6% (p/v), NaCl 0.95% (p/v). Les cellules ont été comptées au moyen d'un hématimètre (Spencer, American Optical Co., Buffalo, NY).

2.2.3 Expériences de stimulation des lymphocytes pour les études de relâchement de calcium.

Les cellules Jurkat E.6.1 ont été transférées dans des tubes de 50 ml à fond conique puis centrifugées à 800xg pendant 5 minutes. Les culots cellulaires ont ensuite été lavés deux fois par centrifugation dans du milieu RPMI 1640/Hepes (9.31g/litre). Après les deux lavages, la viabilité et le nombre de cellules ont été déterminés et les cellules ont été resuspendues dans du milieu RPMI 1640/Hepes à la concentration désirée.

2.2.4 Incubation des cellules Jurkat avec les diverses drogues

Les cellules Jurkat ont été préparées de la façon décrite dans la section 2.2.3 pour obtenir 5×10^6 cellules/ml. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37°C avec les différentes concentrations des drogues indiquées au tableau 1. Suite à l'incubation, les cellules ont été soit utilisées pour les études d'incorporation de thymidine tritiée, pour l'isolement des noyaux ou pour faire des études de mesures de calcium.

2.2.5 Essai d'incorporation de thymidine tritiée

Suite à l'incubation de 24 heures avec les différentes drogues, les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes et lavées deux fois avec le milieu RPMI 1640. A différents temps, les cellules ont été distribuées dans des plaques de 96 puits (200 μ l) et incubées pendant 1 heure avec 2 μ Ci/ml de thymidine tritiée. Par la suite, les cellules ont été aspirées sur des filtres par un système d'aspiration (Cell Harvester Brandel, Gaithersburg, MD) et lavées deux fois avec de l'eau distillée pour enlever l'excédent de thymidine tritiée non incorporée. Les filtres ont ensuite été séchés et comptés grâce à un compteur bêta Beckman suite à l'addition de 4 ml de liquide à scintillation Ready Safe (Beckman).

2.2.6 Préparation des noyaux pour les études de cytofluorimétrie

Les cellules Jurkat incubées avec les différentes drogues (section 2.2.4) ont été préparées et lavées comme indiqué dans la section 2.2.3 afin d'obtenir 4 x10⁶ cellules. Les étapes suivantes ont été exécutées sur glace. Après avoir centrifugées les cellules pendant 5 minutes dans un tube de 50 ml à fond conique, les cellules ont été resuspendues dans 20 ml de PBS froid (g/l: NaCl, 8, KCl, 0.2, Na₂HPO₄, 1.15, KH₂PO₄, 0.2). De nouveau, les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes. Le culot a par la suite été resuspendu dans 5 ml de NP-40 à 0.3% (v/v) préparé dans du tampon de polyamines (mM): Tris.HCl, 15, spermine, 0.2, spermidine, 0.5, EDTA, 2, EGTA, 0.5,

KCl, 80, NaCl, 20, β -mercaptoéthanol, 14. Les cellules ont été agitées doucement et le tout a été laissé pendant 5 minutes sur glace pour permettre la lyse complète. Les noyaux ainsi extraits ont été centrifugés pendant 2 minutes à 1500 rpm. Le culot a ensuite été resuspendu dans 5 ml d'une solution contenant de la Rnase (50 U/ml préparée dans du tampon de polyamines) et incubé pendant 1 heure à 37°C. On ajoute ensuite 50 μ g/ml final de bromure d'éthidium. Les noyaux sont ainsi prêts pour les études de cytofluorimétrie. Il est à noter que les noyaux préparés de cette façon sont stables pendant plusieurs heures à 4°C.

2.2.6.1 Analyse des noyaux par cytofluorimétrie

Les études de cytofluorimétrie ont été exécutées sur un appareil FACScan de la compagnie Becton-Dickinson (Mississauga, ON) couplé à un microordinateur Hewlett Packard. Les noyaux préparés de la façon décrite dans la section 2.2.6 ont été analysés au cytofluorimètre où les données de fluorescence individuelle ont été enregistrées. Un logiciel (Consort 30) permet la sélection des noyaux acheminés à l'appareil ainsi que le nombre de noyaux comptés (événements). Les données statistiques ont été obtenues grâce à un programme d'analyse de fluorescence (DNA), où il est possible de représenter graphiquement la distribution des noyaux selon les phases G1, S et G2/M.

2.2.7 Détermination spectrophotométrique et mesures de calcium intracellulaire

Les expériences ont été réalisées de façon similaire à celles décrites par Tsien et coll (1982). D'abord les cellules ont été préparées comme décrit à la section 2.2.3 et resuspendues à une concentration de 5×10^6 cellules/ml dans un milieu contenant (mM): NaCl, 125, KCl, 5, NaH_2PO_4 , 1, glucose, 5.6, Hepes, 25 (pH 7.4). La suspension cellulaire a été transférée dans des tubes Falcon de 5 ml. Une solution de Fura2-AM (1mM) dans du DMSO a été ajoutée à une concentration finale de $3\mu\text{M}$. La suspension a été protégée de la lumière et agitée occasionnellement pendant une heure à la température de la pièce. Les cellules ont été transférées dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml puis ont été lavées de 3 à 5 fois dans le même milieu d'incubation (5 secondes à vitesse maximale d'une centrifugeuse Eppendorf, modèle 5414). Les cellules ont ensuite été placées dans une cuvette thermostatée (37°C) et maintenues sous agitation mécanique. L'appareil utilisé était un spectrofluorimètre SPF-500C de la compagnie Aminco SLM Instruments Inc. (Urbana, IL). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission étaient de 340nm et 505 nm respectivement. La fente a été ajustée à 5 nm.

La concentration intracellulaire de calcium a été calculée suivant l'équation (Grinkiewicz et coll., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

K_d : constante de dissociation (225 nM à 37°C)

F: valeur de la fluorescence mesurée

F_{max}: valeur de la fluorescence maximale mesurée en lysant les cellules par traitement avec le Triton X-100 (50 μ l d'une solution aqueuse de 10%, (v/v)).

F_{min}: valeur de la fluorescence minimale mesurée en présence d'EGTA (50 μ l d'une solution de 125mM EGTA/100mM Tris, pH 9) suivant la lyse des cellules.

2.2.8 Préparation des cellules pour l'observation en microscopie électronique à balayage

Les cellules Jurkat, 5×10^6 , ont été traitées à différents temps avec de la colchicine 10 μ M. Après les avoir fait adhérer sur des lamelles de verre de 12.5mm de diamètre pré-traitée à la poly-L-lysine 0,1%, les cellules ont été lavées avec du tampon cacodylate de sodium 0.1M, pH 7.4, préfixées pendant 30 minutes à 37°C avec de la glutaraldéhyde 1.5% tamponnée avec du cacodylate de sodium 0.1M. Ensuite, les cellules ont été fixées de nouveau avec de la glutaraldéhyde à 2.8% pendant 30 minutes à la température de la pièce. Après lavage avec le tampon cacodylate 0.1M, les cellules ont été post-fixées au tétroxyde d'osmium (OsO₄) pendant une heure à la température de la pièce.

Après lavage avec le tampon cacodylate 0.1M, les cellules ont été déshydratées avec une série ascendante d'éthanol de 30% à 100% pendant 10 minutes pour chaque traitement. Ensuite, les cellules ont été séchées par la méthode de séchage par point

critique (CPD) directement à partir du CO₂, sans liquide intermédiaire.

Pour l'observation au microscope électronique à balayage, les lamelles ont été montées sur des supports en aluminium, rendues conducteurs par évaporation d'une couche de 15nm d'or par la méthode de pulvérisation cathodique ("sputter coating") et examinées avec un microscope électronique à balayage Cambridge Stereoscan 120 (Cambridge Instruments, Montréal) sous une tension d'accélération de 15 kv.

2.2.9 Techniques utilisées pour la mise en évidence de la P-glycoprotéine.

Des études d'analyses de type Northern ont été entreprises afin de mettre en évidence la présence du message de la P-glycoprotéine. La première étape a été celle d'isoler la sonde pour le gène MDR1 de foie humain présent dans un plasmide contenu dans une souche de *E. coli*. Parallèlement, de l'ARN de cellules Jurkat a été isolé ce qui a pu permettre l'hybridation avec la sonde MDR marquée au ³²P par la technique du "Multiprime" (Amersham, Montréal). Les techniques utilisées sont des protocoles décrits par Maniatis et collaborateurs (1982).

2.2.9.1 Isolement des plasmides

La sonde pour le gène MDR1 de foie humain contenu dans une souche de *E. coli*, DH5alpha, a été obtenu de ATCC (Produit ATCC # 65704, Rockville, MD). Après

avoir inoculé 5 ml d'une colonie de bactéries, la culture a été incubée pendant une nuit puis échantillonnée dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml et centrifugée pendant 1 minute à vitesse maximale (centrifugeuse Eppendorf). Le surnageant a été enlevé par aspiration et 100 μ l d'une solution froide contenant (mM): glucose, 50, EDTA, 10, Tris-HCl, 25 (pH 8) ont été ajoutés et le tout agité sur Vortex. Le tout est resté au repos pendant 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 200 μ l d'une solution fraîchement préparée de 0.2N de NaOH et 1% SDS ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés par inversion et laissés sur glace pendant 5 minutes. Une solution (150 μ l) d'acétate de potassium (60 ml de 5M d'acétate de potassium, 11.5 ml d'acide acétique glacial et 28.5 ml d'eau) ont été ajoutés aux tubes et le tout a été mélangé sur Vortex pendant 10 secondes et laissé sur glace pendant 5 minutes. Les tubes ont été centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à vitesse maximale (centrifugeuse Eppendorf). Le surnageant a été transféré dans des tubes Eppendorf auxquels on a ajouté un volume égal de phénol (saturé avec un tampon Tris 0.1M pH 7) et de chloroforme. Le tout a été mélangé sur Vortex et centrifugé pendant 2 minutes. Le surnageant a de nouveau été transféré dans de nouveaux tubes Eppendorf. L'extraction phénol/chloroforme a été répétée ainsi qu'une extraction chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Deux volumes d'éthanol ont été ajoutés au surnageant et le tout agité sur Vortex et laissé à la température de la pièce pendant 2 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à la température de la pièce pendant 5 minutes. Le surnageant a été enlevé par aspiration et le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. De nouveau, le culot a été mélangé sur Vortex rapidement et centrifugé pendant 1 minute. Le culot a été séché dans un

dessiccateur sous vide et les plasmides ont été resuspendus dans 10 μ l de tampon TE (pH 8) contenant 20 μ g/ml de RNase. La pureté des plasmides a été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%.

2.2.9.2 Isolement de la sonde MDR1 de foie humain

Les plasmides préparés dans la section 2.2.9.1 contiennent l'ADNc codant pour le gène MDR1 de foie humain. Grâce à une digestion avec l'enzyme XbaI, il a été possible de séparer la sonde du plasmide. Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% a permis de séparer le produit de digestion: une bande de 4.1Kb correspondant à l'ADNc et une bande de 3.2Kb correspondant au restant du plasmide, pGEM-3Zf. La bande correspondant à l'ADNc a été coupée et déposée dans un tube Eppendorf de 0.5ml perforé de plusieurs trous produits par une aiguille. Ce tube Eppendorf a été lui-même déposé sur un autre tube Eppendorf de 0.5ml qui lui n'a qu'un seul trou à sa base où se trouve un morceau de filtre GF-C (Millipore, Montréal) pour retenir l'agarose lors de la centrifugation. Finalement, un tube Eppendorf de 1.5ml a été placé à la base des deux premiers afin de recueillir l'ADN. Ce montage a été déposé dans une centrifugeuse Eppendorf et centrifugé pendant 10 minutes à vitesse maximale. La sonde et le TAE contenu dans le gel se retrouve dans le tube Eppendorf de 1.5ml tandis que l'agarose est retenue par le filtre. L'ADN a été ensuite précipitée avec 1ml d'éthanol, mélangée par Vortex et centrifugée pendant 5 minutes. Le surnageant a été enlevé par aspiration et le culot a été séché sous vide. L'ADN a été resuspendu dans 10 μ l de

tampon TE.

2.2.9.3 Radiomarquage de la sonde

Le radiomarquage de la sonde a été effectué selon la technique du "Multiprime DNA labelling systems" (RPN.1600Y) de la compagnie Amersham (Montréal). Suite au marquage, la sonde a été chromatographiée sur une colonne de Sephadex (G50) équilibrée dans du tampon STE afin d'éliminer les nucléotides non incorporés. Un échantillon de 1 μ l de la sonde ainsi purifiée a été déposé dans un flacon à scintillation et compté sur un compteur bêta Beckman.

2.2.9.4 Isolement de l'ARN total des cellules Jurkat E.6.1

L'isolement de l'ARN a été effectué selon le protocole proposé par Chomczynski et Sacchi (1987). Les cellules Jurkat ont été préparées comme indiqué à la section 2.2.3 pour obtenir 10^7 cellules/ml (les quantités indiquées ici sont calculées pour 10^7 cellules). La lyse cellulaire a été faite en ajoutant 0.1 ml d'acétate de sodium 2M pH 4, 1 ml de phénol saturé d'eau, 0.2 ml de chloroforme/alcool isoamylique (49:1) et 1 ml de solution D filtrée (4M thiocyanate de guanidine, 25mM de citrate de sodium pH 7, 0.5% laurylsarcosine et 0.1M β -mercaptoéthanol). Le tout a été mélangé par inversion pendant 10 secondes et laissé sur glace pendant 15 minutes. Le lysat cellulaire a été distribué dans des tubes Eppendorf de 1.5ml pour être centrifugé à 10 000xg

pendant 20 minutes à 4°C. La phase aqueuse a été enlevée et déposée dans d'autres tubes Eppendorf auxquels on a ajouté 1/2 volume total de phénol/eau et 1/2 volume total de chloroforme/alcool isoamylique (49:1). Les tubes ont été centrifugés à nouveau à 10 000xg pendant 20 minutes à 4°C. Cette extraction a été répétée une seconde fois. Par la suite, l'ARN a été précipité par l'addition de 1 ml d'isopropanol (ou 2.5 ml d'éthanol) pour une durée de 2 heures à -20°C. Les tubes ont été centrifugés à 10000xg pendant 20 minutes à 4°C, le culot a été resuspendu dans 0.3 ml de solution D et 1 volume total d'isopropanol a été ajouté. Le tout a été placé à -20°C pendant une heure. Ensuite, les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et le culot a été resuspendu dans 100µl d'une solution d'acétate de sodium (3M d'acétate de sodium pH 6, 1mM EDTA et 0.1% de laurylsarcosine). Le tout a été reprecipité par addition de 0.55 volume d'éthanol pendant 30 minutes à -20°C et 15 minutes à -70°C. Après centrifugation à 10 000xg pendant 10 minutes à 4°C, le culot a été lavé avec de l'éthanol 75%. Le culot a été séché pendant 5 minutes dans un dessiccateur sous vide et ensuite resuspendu dans 20µl d'eau stérile. L'ARN a été congelé à -70°C jusqu'à son utilisation.

Pour vérifier la pureté de l'ARN, un gel d'agarose traité au diéthylpyrocarbonate a été préparé de la façon suivante: 0.25g d'agarose, 0.5ml TAE 50X, 24.5ml d'eau et 0.25ml de diéthylpyrocarbonate. Les densités optiques à 260nm et 280 nm ont permis d'évaluer la pureté de l'échantillon. En fait, le rapport 260 sur 280 doit être le plus près de 2 possible et une densité optique de 1 pour une longueur d'onde de 260

correspond à 40 μ g d'ARN.

Ce protocole de préparation d'ARN fait appel à l'utilisation de matériel stérile et de solutions traitées au diéthylpyrocarbonate, un inhibiteur des ribonucléases, ce qui améliore le rendement.

2.2.9.5 Transfert de l'ARN sur membrane de nylon

L'ARN préparé à la section 2.2.9.4 a été séparé par électrophorèse sur gel dénaturant de formaldéhyde avant d'être transféré sur membrane de nylon. Le gel d'agarose dénaturant a été préparé de la façon suivante : agarose, 1.2g, eau, 86.4ml, formaldéhyde 30%, 21.6ml, bromure d'éthidium 10mg/ml, 4 μ l). Les échantillons ont été préparés comme suit: ARN, 40 μ g, formamide déionisée, 10 μ l, formaldéhyde 30%, 3.5 μ l et 10XMOPS (0.2M acide morpholinopropanesulfonique MOPS, 50mM acétate de sodium et 10mM EDTA pH 8), 2 μ l. Les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 5 minutes avant leur dépôt sur gel avec 2 μ l de tampon de migration (50% glycérol, 1mM EDTA, 0,4% bleu de bromophénol, 0,4% xylène cyanol). La migration a été effectuée à 65 volts pendant 2 heures jusqu'à ce que le xylène cyanol atteigne l'extrémité du gel. Une fois la migration terminée, le gel a été déposé pendant 15 minutes dans de l'eau stérile afin de permettre la diffusion de bromure d'éthidium avant de prendre une photo.

Pour le transfert, une membrane Hybond-N (Amersham, Montréal) a été trempée pendant 10 minutes dans une solution de 20XSSC (175.3g NaCl, 88.2g citrate de sodium, 800ml d'eau, pH 7) et montée sur un appareil modifié "Vacublot" (Tyler Research Instruments, Ville St-Laurent, Québec). Cet appareil permet le transfert de matériel d'un gel sur une membrane par un procédé d'aspiration sous vide. Ainsi, un vide de 50 cm d'eau a été exercé sur le gel monté sur la membrane de nylon. Le gel a été recouvert d'eau pour une période de 5 minutes. Par la suite, l'eau a été enlevée et le gel a été recouvert de 50mM NaOH/10mM NaCl pendant 5 minutes. De nouveau, la solution a été enlevée pour faire place à une solution de 0.1M Tris-HCl pH 7.6 pour une durée de 5 minutes. La solution de Tris a été époncée et remplacée par la solution de 20XSSC pour la durée du transfert (2-3 heures). Suite au transfert, la membrane de nylon a été trempée dans du tampon 20XSSC pendant 5 minutes. La membrane a ensuite été séchée à l'air pendant 45 minutes et ensuite chauffée à 80°C pendant 2 heures, sous vide, pour permettre la fixation de l'ARN. Suite à ce traitement, une photo de la membrane a été prise pour vérifier la présence de l'ARN. Parallèlement, le gel a été déposé dans une solution de bromure d'éthidium 10mg/ml pendant 10 minutes afin de s'assurer du transfert de l'ARN.

2.2.9.6 Préhybridation et hybridation de la membrane

La membrane a été déposée dans un sac d'hybridation (Kapak/ScotchPak, Minneapolis, MN) avec 20ml de cocktail à hybridation : 25mM Tris-HCl pH 7.5, 1M

NaCl, 0.2% SDS, 100 μ g/ml de sperme de saumon et 50 μ g/ml de ARNt de levures. La pré-hybridation a été effectuée à 57°C pendant 1 heure. Ensuite, 3x10⁶ cpm/ml de la sonde chauffée à 95°C pendant 10 minutes a été ajoutée au sac d'hybridation pour toute la nuit, à 57°C, sous faible agitation.

2.2.9.7 Lavage de la membrane

La membrane a ensuite été retirée du sac d'hybridation et déposée dans un plat contenant une solution de lavage 2XSSC/1% SDS pendant 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, le liquide a été enlevé, de façon appropriée, et un deuxième lavage avec la même solution a été effectué d'abord pendant 5 minutes à la température de la pièce et par la suite 30 minutes à 57°C. La solution de lavage a été remplacée par une solution de 1XSSC/0.5%SDS pendant 30 minutes à 57°C. Un dernier lavage avec 1XSSC a été effectué pour enlever le SDS restant et ce pendant 10 minutes.

La membrane a été enveloppée dans une pellicule plastique et déposée dans une cassette en présence d'un film XAR de la compagnie Kodak, pour une période de 24 heures à -70°C. Dans certains cas, il a été nécessaire de refaire les lavages de la membrane et d'exposer la membrane plus longtemps.

2.2.10 Etudes d'influx de vinblastine

Les études d'influx de thymidine tritiée ont été réalisées en se basant sur des protocoles décrits dans la littérature (Cole et coll., 1991; Skovsgaard, 1978; Willingham et coll., 1986). Des cellules Jurkat ont été préparées comme décrit dans la section 2.2.3 afin d'obtenir 5×10^6 cellules/ml dans un milieu RPMI sans glucose (2-déoxyglucose, 2g/l). Les cellules ont ensuite été distribuées dans des plaques à 96 puits à raison de 200 000 cellules/puits. A chacun des puits, $2 \mu\text{M}$ de vinblastine tritiée ($0.25 \mu\text{Ci/ml}$) ont été ajoutés. Trois conditions d'expérimentation ont été essayées soient des cellules Jurkat témoins (dans un milieu RPMI avec glucose, 2g/l), soient des cellules Jurkat en présence de vérapamil ($9 \mu\text{M}$) (dans un milieu RPMI avec glucose, 2g/l) ou soient en absence d'ATP (10mM de NaN_3) à 37°C . A différents temps, la réaction a été arrêtée en ajoutant $400 \mu\text{l}$ d'une solution de 1%BSA/PBS froide et les cellules ont été déposées sur filtres par un système d'aspiration (Cell harvester model 24 V, Brandel, Gaithersburg, MD) et lavées et centrifugées deux fois avec la solution (4°C) de 1%BSA/PBS. La radioactivité incorporée dans les cellules a été comptée grâce à un compteur bêta Beckman après addition de 4ml de liquide à scintillation Ready Safe (Beckman).

2.2.11 Etudes d'efflux de la vinblastine

Les expériences d'efflux de la vinblastine tritiée ont été faites de façon analogue

à celle décrites à la section 2.2.10. Les cellules ont été mises en présence de la vinblastine tritiée et en présence de vérapamil (et glucose, 2g/l) ou de NaN_3 (sans glucose), selon les cas, pendant une période de 60 minutes à 37°C afin de permettre un équilibre d'influx et d'efflux. Suite à ce temps d'incubation, la réaction a été arrêtée par addition de 400 μ l d'une solution de 1%BSA/PBS froide et les cellules ont été lavées deux fois par centrifugation à 4°C avec ce même milieu. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans du milieu RPMI avec glucose, libre de drogues à 37°C. A différents temps, les cellules ont été lavées à nouveau deux fois par centrifugation avec le milieu 1%BSA/PBS froid. Le culot obtenu, l'extrémité du tube Eppendorf a été coupé et transféré dans des flacons à scintillation et les cellules ont ensuite été lysées dans des flacons à scintillation par ajout de SDS 1% au culot et le contenu radioactif a été mesuré grâce au compteur bêta Beckman après addition de 4ml de liquide à scintillation Ready Safe (Beckman).

2.2.12 Préparation des microsomes

Ce protocole exige initialement une quantité considérable de cellules soit 5 à 7x10⁹ cellules pour donner une quantité de 15 à 30 mg de protéines cytoplasmiques. Suite à la préparation des cellules selon la section 2.2.3, 5 à 7x10⁹ cellules ont été suspendues dans 150 ml de milieu (mM): NaCl, 65, KCl, 75, Hepes, 10 (pH 7.4), PMSF, 0.2, DTT, 1 et en présence de deux gouttes d'octanol. Le tout a été déposé dans un b cher de plastique que l'on a introduit dans une chambre de rupture cellulaire

(Parr Instrument Cie, Moline, Illinois), sous agitation (barreau magnétique). Ensuite, une pression de 30 atmosphères a été exercée pendant 20 minutes à 4°C. Le lysat a été récupéré dans un erlenmeyer en ouvrant lentement la valve de sortie pour permettre un relâchement goutte à goutte. Le lysat cellulaire a été centrifugé à 14,600xg pendant 30 minutes pour permettre l'élimination des cellules non lysées, des noyaux et de la fraction mitochondriale. Au surnageant résultant, on a ajouté goutte à goutte du MgSO_4 jusqu'à une concentration finale de 0.5mM. Ensuite, le tout a été déposé sur un coussin de sucrose 60% contenu dans des tubes de polycarbonate de 38.5ml. Le tout a été centrifugé à 120,000xg pendant 2 heures. Le coussin de sucrose empêche les microsomes de se compacter en un culot difficile à resuspendre lequel forme une couche blanchâtre au dessus du coussin. Le contenu protéique des microsomes a été dosé par la technique de Lowry modifiée (Peterson, 1977). Il est possible de conserver les microsomes par congélation à -70°C après addition de 1mM de DTT, 14% de glycérol et 1,4% de sorbitol.

2.2.13 Perméabilisation cellulaire

Les cellules Jurkat ont été préparées comme indiqué dans la section 2.2.3 pour obtenir 30×10^6 cellules/ml et suspendues dans un milieu de perméabilisation (mM): Hepes, 20, KCl, 110, NaCl, 10, MgCl_2 , 2, KH_2PO_4 , 5 (pH 7.2)). La perméabilisation a été faite grâce à l'addition de saponine 30 $\mu\text{g/ml}$ pendant 5 minutes à 37°C en présence de 20 μl de 100mM d'EGTA et 10 μl de 100mM de DTT. Après

perméabilisation, la toxine a été enlevée par trois lavages des cellules dans le milieu de perméabilisation en centrifugeant dans une centrifugeuse Eppendorf à vitesse maximale pendant 3 secondes. Les cellules sont ensuite prêtes à utiliser pour les études de relâchement de calcium décrites dans la section 2.2.7.

2.2.14 Mise en évidence du récepteur à la ryanodine

La mise en évidence de la présence du récepteur à la ryanodine chez les Jurkat E.6.1 a été faite selon les protocoles décrits par Lai et coll (1988) et par Campbell et coll. (1987).

2.2.14.1 Essai d'isolement du récepteur à la ryanodine

Afin de mettre en évidence le récepteur à la ryanodine des cellules Jurkat E.6.1, les premières étapes ont été effectuées selon le protocole indiqué à la section 2.2.12. En fait, suite à la lyse cellulaire (cavitation à l'azote) et à la centrifugation de 14 600xg pendant 30 minutes, le surnageant a été déposé sur un coussin de sucrose 60% afin de permettre l'obtention des microsomes. Le contenu en protéine de la bande blanchâtre, correspondant aux microsomes, a été dosée par la technique de Lowry. Afin de poursuivre les étapes de purification, 1.3mg de protéines a été utilisé. Les microsomes ont été dilués dans 1 ml de tampon d'isolement: 1M NaCl, 150 μ M de CaCl₂, 100 μ M EGTA, 25mM PIPES pH 7.1, 1.8% CHAPS, 3mg/ml phosphatidylcholine (dissout dans

un volume minimum de méthanol ajouté sous forte agitation), 2mM AMP-PCP et des inhibiteurs de protéases comme l'aprotinine (76,8nM) et le benzamidine (0.83mM). Le tout a été traité pendant 2 heures à 23°C et ensuite centrifugé pendant 1 heure à 100 000xg. Le surnageant a été déposé sur un gradient linéaire de sucrose 5-20% et centrifugé à 26,000 rpm pour une période de 16 heures. Chaque gradient de sucrose a ensuite été séparé en quatre fractions de densité différente. Chaque fraction, FR1, FR2, FR3, FR4 (correspondant à la densité la plus faible), a ensuite été chromatographiée sur une colonne d'héparine-agarose (Sigma, St-Louis, MO).

Les fractions FR1, FR2, FR3 et FR4 ont d'abord été diluées pour avoir une concentration finale de 0.1M en NaCl. Ensuite, les échantillons ont été déposés sur une colonne d'héparine-agarose et élués séquentiellement avec des solutions variantes de NaCl (0.1M, 0.2M, 0.4M et 0.8M) dans le tampon d'isolement. Les échantillons résultants ont été concentrés par centrifugation en utilisant des tubes Centricon 10 (Amicon Corp, Beverly, MA)

2.2.14.2 Etudes de liaison de la ryanodine

Un protocole modifié de Imagawa et coll. (1987) a été utilisé. Les échantillons concentrés tel que décrit à la section 2.2.14.1 ont été dosés à nouveau afin d'obtenir 100µg de protéines de chaque fraction dans le tampon de liaison suivant: 1M NaCl, 0.1mM EGTA, 0.15mM CaCl₂, 20mM MOPS pH 7.4, 5mM ATP.Na, 2mM DTT. Le

volume nécessaire pour avoir 100 μ g de protéines étant déterminé, une concentration de 20nM de ryanodine tritiée a été ajoutée aux tubes qui ont été incubés pendant une heure à 37°C. Ensuite, 1 μ M à 10 μ M de ryanodine non radioactive, ou un volume égal de tampon de liaison, ont été ajoutés afin de déterminer la liaison non spécifique et spécifique, respectivement. Par la suite, un volume égal de polyéthylène glycol 8000 20% (p/v) (4°C) a été ajouté pour permettre la précipitation. Les échantillons ont ensuite été collectés par filtration et les filtres déposés dans des flacons à scintillation et comptés sur compteur bêta Beckman suite à l'addition de 4ml de liquide à scintillation Ready Safe (Beckman).

2.2.14.3 Etudes d'analyse de type Western du récepteur à la ryanodine

Suite aux études de liaison de ³H-thymidine des fractions FR3 et FR4, des études d'analyse de type Western ont été faites. Pour ce faire, un gel à gradient d'acrylamide de 5-15% a été préparé et 50 μ g (protéines) des fractions FR3 et FR4 ont été déposées. Un témoin de protéines de référence et deux extraits de muscles squelettique et cardiaque de lapin contenant le récepteur à la ryanodine (généreusement donnés par le Dr. Rousseau), ont également été déposés. Suite à la migration à 60mA sous système de réfrigération, le gel a été transféré sur une membrane Immobilon-P (Millipore, Montréal) grâce à un appareil de transfert (BioRad, Richmond, CA).

Le montage sur l'appareil de transfert (BioRad) a été effectué de la façon

suivante. Après l'électrophorèse, le gel a été équilibré dans 250ml du tampon de transfert pendant 10 minutes sous faible agitation. Le tampon de transfert est le suivant: 25mM de Tris, 192mM de glycine, 20% de méthanol et 1% de SDS, pH 8.3. Parallèlement, la membrane Immobilon-P a été trempée pendant 1 minute dans le méthanol, 1 minute dans de l'eau distillée et 10 minutes dans le tampon de transfert. Le côté foncé de l'appareil pour assembler le gel avec la membrane est déposé dans le fond d'un plat contenant du tampon de transfert pour y accueillir ensuite le morceau de fibre, 2 papiers filtres 3M, le gel, la membrane d'Immobilon-P, 2 papiers filtres 3M, le morceau de fibre et le tout est refermé par le côté clair de l'appareil d'assemblage, le côté clair allant du côté de l'anode. Le transfert a été exécuté toute la nuit à 20 volts à 4°C.

2.2.14.4 Analyses avec un anticorps anti-ryanodine

Le montage de transfert a été démonté, le gel a été coloré à l'argent (Annexe) pour s'assurer du transfert et la membrane a été déposée dans une solution permettant de masquer les sites non spécifiques (solution B): 20mM Tris-HCl pH 7.4, 0,05% Tween 20 et 0.4% BSA, pendant 2 heures sous forte agitation. Une solution fraîche a été ajoutée et l'agitation poursuivie pendant une autre heure. Ensuite, une dilution 1:1000 de l'anticorps dirigé contre le récepteur à la ryanodine du muscle squelettique de lapin (généreusement donné par le Dr. Meissner, Chapel Hill, NC) diluée dans la solution B a été mise en présence de la membrane pour toute la nuit. La membrane a

subit 2 lavages rapides sous forte agitation et deux lavages de 15 minutes avec la solution B. Un deuxième anticorps anti-IgG de lapin couplé à la biotine dilué 1:20000 dans la solution B a été ajouté pour une période de 3 heures, sous faible agitation. Des lavages comme précédemment ont été faits et la membrane a été incubée ensuite avec 20 μ g de streptavidine-peroxydase pendant une heure.

La détection des bandes sur la membrane d'Immobilon-P a été effectuée avec le système de chemiluminescence ECL (Amersham, Montréal). Il suffit de mélanger 1:1 les réactifs de détection 1 et 2 que l'on imbibe ensuite la membrane en prenant soin d'enlever l'excès. Le tout a ensuite été enveloppé dans une pellicule plastique, mis dans une cassette et exposé pendant différents temps à des films XRP de la compagnie Kodak.

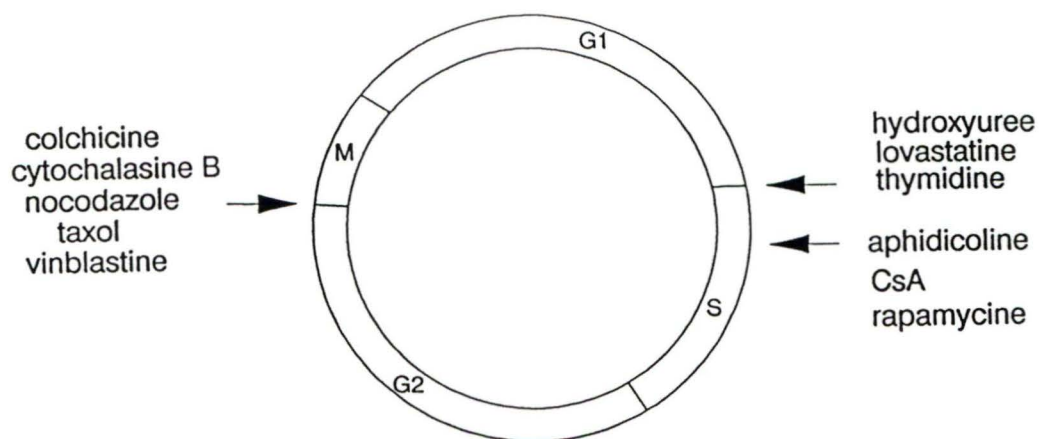
3. RESULTATS

3.1 Synchronisation cellulaire

Des essais de synchronisation cellulaire des Jurkats E.6.1 ont été effectués en utilisant une série de drogues agissant spécifiquement à divers endroits du cycle cellulaire. Les drogues utilisées peuvent être classifiées en trois groupes, celles qui induisent l'arrêt cellulaire en phase G1/S, celles qui arrêtent les cellules en phase S précoce et celles qui bloquent en phase G2/M (Tableau 1).

3.1.1 Etude d'incorporation de thymidine tritiée

Suite à une incubation de 24 heures avec différentes concentrations de lovastatine, nous avons étudié l'incorporation de thymidine tritiée en fonction du temps. La figure 8 (en médaillon) montre les résultats obtenus de la littérature utilisant des lymphocytes de chien traités à l'hydroxyurée (Lorhmann et coll., 1974). L'hydroxyurée arrête le cycle cellulaire en phase G1/S, ce qui a comme effet de permettre une incorporation de thymidine tritiée une fois que le bloc est enlevé tel qu'évident dans les heures suivantes (Lorhmann et coll., 1974). Sur cette figure, on peut observer un pic entre 0 et 4 heures suite à l'enlèvement du bloc. La figure 8 montre les résultats comparatifs obtenus en utilisant les lymphocytes Jurkat. Par comparaison avec les lymphocytes de chien, aucune corrélation ne ressort de nos expériences même

Tableau 1: Résumé des drogues utilisées et de leur site d'action dans le cycle cellulaire.

DROGUE	CONCENTRATIONS	EFFET
Hydroxyurée	50 mM et 100mM	inhibe la ribonucléotide réductase
Lovastatine	25 μ M, 50 μ M et 100 μ M	inhibe la HMG-CoA
Nocodazole	1 μ g/ml et 2 μ g/ml	inhibe la polymérisation des microtubules
Colchicine	10 μ M et 20 μ M	inhibe la polymérisation des microtubules
Vinblastine	10 μ M et 20 μ M	inhibe la polymérisation des microfilaments
Cytochalasine B	2mg/ml, 5mg/ml 10mg/ml	inhibe la polymérisation des microfilaments
Aphidicoline	5 μ g/ml	inhibe l'ADN polymérase α
Taxol	0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 20 μ M	stabilise le cytosquelette
Thymidine	20mM et 40mM	inhibe la ribonucléotide réductase
Cyclosporine A	0.1 μ M et 1 μ M	empêche la production d'IL-2
Rapamycine	10nM, 100nM et 1 μ M	inhibe la S6 kinase

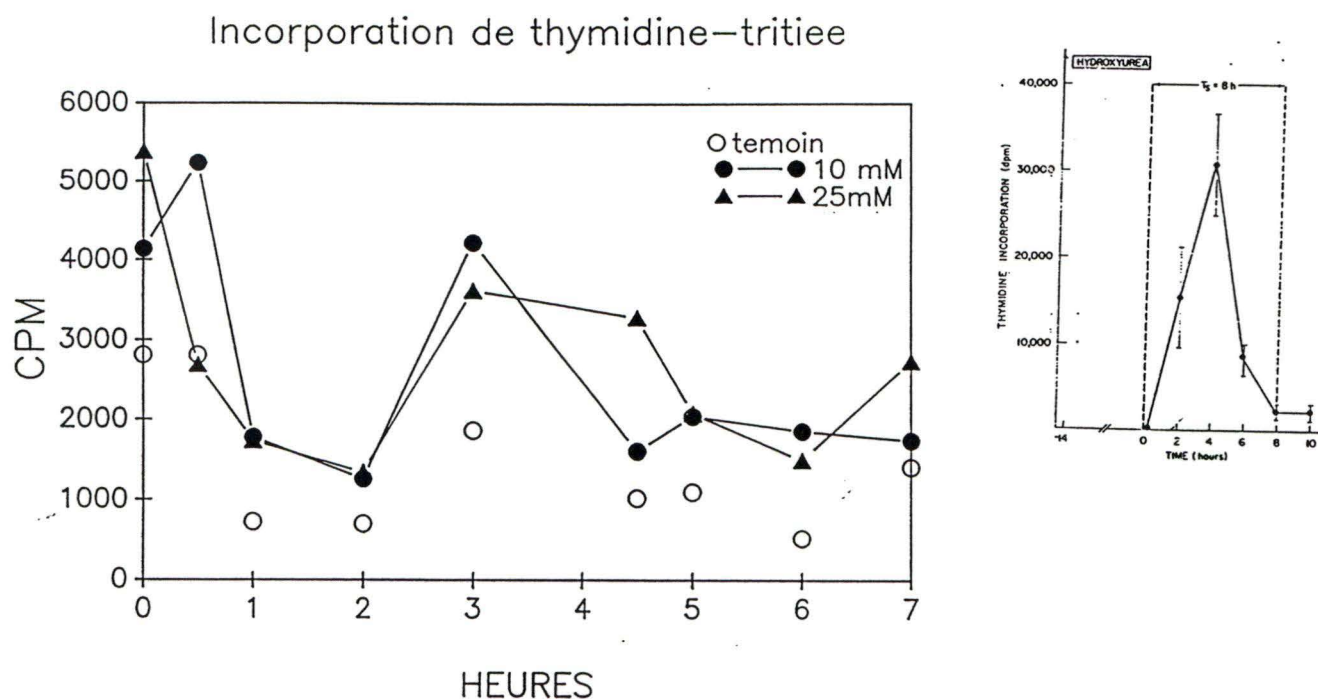


Figure 8: Incorporation de thymidine tritiée chez les cellules Jurkat E.6.1. Les cellules Jurkat, 5×10^6 cellules/ml, ont été incubées pendant 24 heures à 37°C en présence de 10 et 25 mM de lovastatine. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois et, à différents temps, $2\mu\text{Ci/ml}$ de thymidine tritiée ont été ajoutées aux cellules distribuées dans des plaques de 96 puits. Les cellules ont été récoltées de façon semi-automatique à différents temps. En médaillon se trouve l'incorporation de thymidine tritiée chez des lymphocytes de chien suite à un arrêt de croissance cellulaire induit par l'hydroxyurée (Lohrmann et coll., 1973)

à diverses concentrations de lovastatine ou d'hydroxyurée. Etant donné les variations importantes dans la mesure de la radioactivité et afin de déterminer la proportion relative de distribution des lymphocytes Jurkat dans les phases du cycle, nous avons procédé à des analyses par cytofluorimétrie.

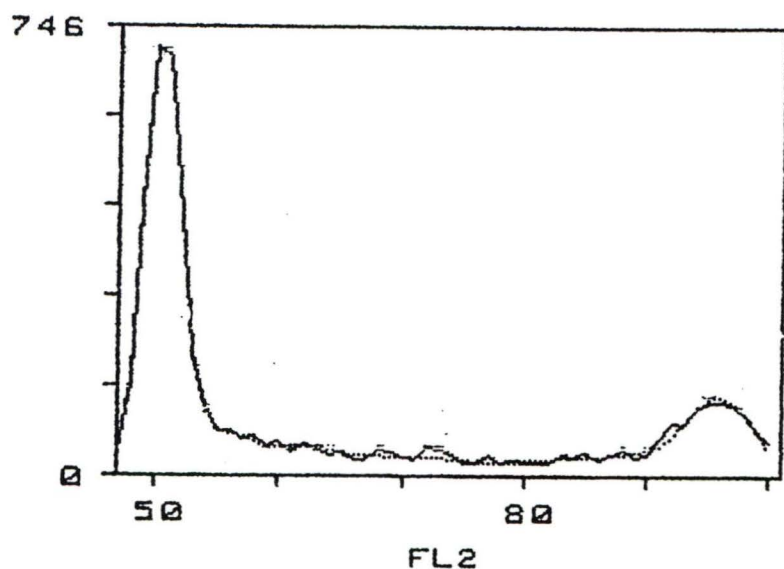
3.1.2 Profil de distribution des lymphocytes Jurkat par analyse de cytofluorimétrie

La technique de cytofluorimétrie permet d'analyser la distribution des cellules dans les diverses phases du cycle cellulaire en utilisant des noyaux préparés comme décrit à la section 2.2.6. Les profils obtenus représentent l'intensité de fluorescence (abscisse) des noyaux ainsi que leur nombre (événements) (ordonnée). Un exemple de la distribution cellulaire des lymphocytes Jurkat E.6.1 est illustré à la figure 9.

3.1.2.1 Effets des drogues bloquant en phase G1/S

Les cellules Jurkats E.6.1 non traitées (Figure 10) montrent un pourcentage de distribution de $44.9 \pm 6.5\%$ en phase G1, $42.3 \pm 8.0\%$ en phase S et de $12.7 \pm 2.8\%$ en phase G2/M. Il n'y a pas de différences significatives de distribution de ces cellules entre les phases G1 et S ($n=19$).

Les drogues utilisées pour bloquer les cellules en phase G1/S ont été l'hydroxyurée (Lohrmann et coll., 1974; Vincent et coll., 1982), la lovastatine (Vincent



Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent	% SD
G1 :	2455	47	2.4
S :	2005	38	0.6
G2+M :	772	15	4.4
Total:	5232	100	

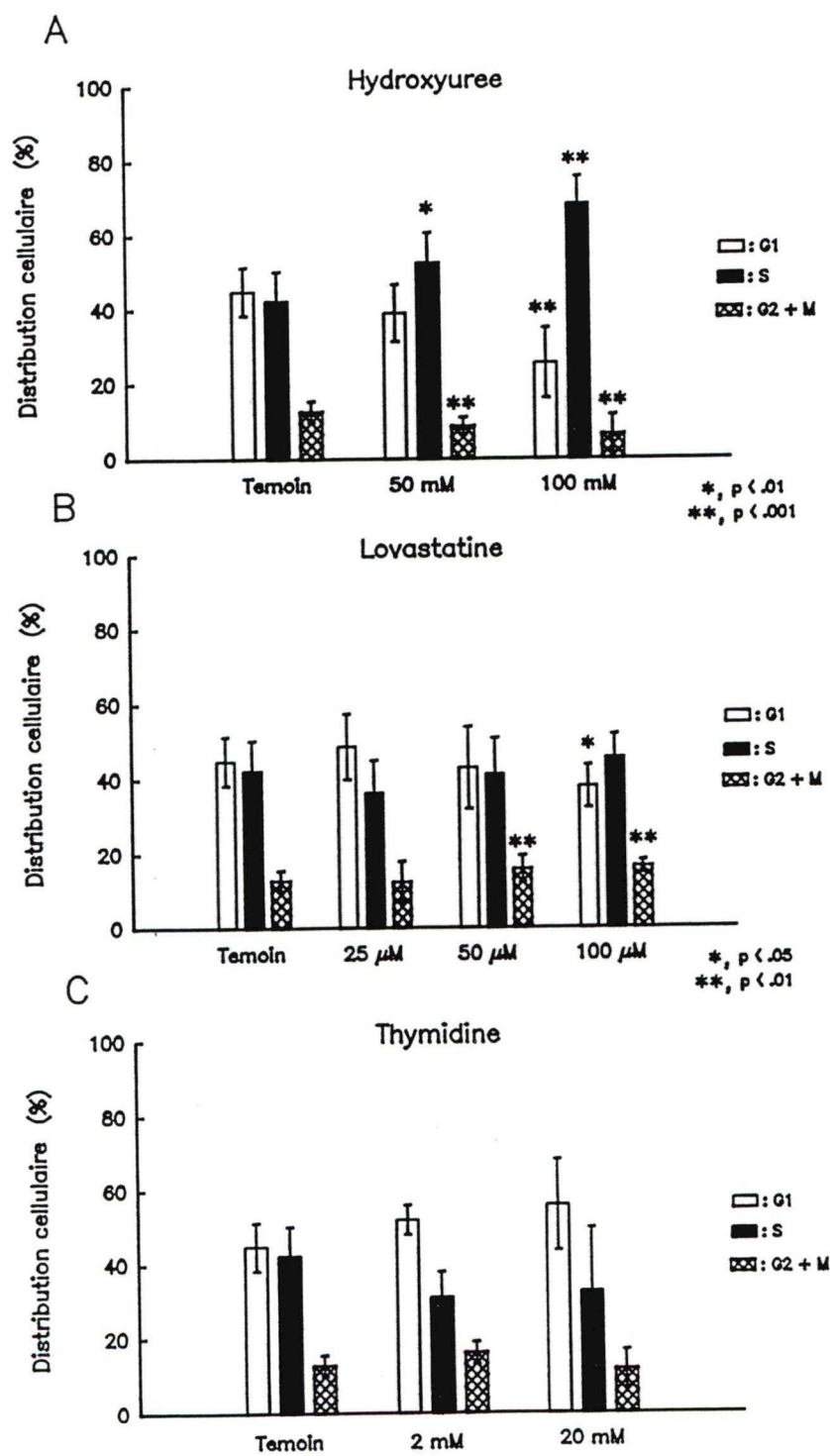
Total Events in Histogram: 10000

Figure 9: Distribution cellulaire des lymphocytes Jurkat E.6.1. Les noyaux des cellules Jurkat ($3 \text{ à } 4 \times 10^6$ cellules) ont été isolés et analysés par cytofluorimétrie (FACScan). Le premier pic de fluorescence correspond aux cellules présentes dans la phase G1, le plateau correspond aux cellules en phase S et le dernier pic correspond aux cellules en phase G2/M.

et coll., 1991) et la thymidine (Sinclair et Bishop, 1965). Les résultats d'analyses de cytofluorimétrie sont illustrés à la figure 10. Il n'y a pas de différences significatives concernant la distribution des cellules en phase G1 quand l'hydroxyurée est utilisée à une concentration de 50mM, mais on peut constater une augmentation de la distribution dans la phase S ($52.5 \pm 8.2 \%$). Une diminution du pourcentage des cellules en phase G2/M est notée comparativement aux cellules Jurkat non traitées. Par contre, lorsqu'on augmente la concentration de l'hydroxyurée à 100mM, le patron de distribution est très différent (Figure 10A). Les différences sont l'augmentation des cellules en phase S ($68.3 \pm 7.5\%$) et une diminution de la phase G1 ($25.5 \pm 9.4\%$) et G2/M ($6.5 \pm 5.2\%$).

Les cellules Jurkat traitées avec de la lovastatine n'ont montré que des différences significatives dans le cas de la phase G2/M ($8.7 \pm 2.4\%$ et $6.5 \pm 5.2\%$ aux concentrations de 50 et $100\mu\text{M}$ respectivement) et de la phase G1 ($25.5 \pm 9.4\%$ à une concentration de $100\mu\text{M}$) (Figure 10B). Dans nos conditions d'expérimentation, la thymidine utilisée à 2 et 20mM s'est avérée inefficace pour l'arrêt des cellules en phase G1/S (Figure 10C).

Figure 10: Pourcentage de distribution des lymphocytes Jurkat E.6.1 dans les phases du cycle cellulaire tel que déterminé par analyses cytofluorimétriques. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml) ont été incubées pendant 24 heures avec *A* 50 et 100mM d'hydroxyurée *B* 25, 50 et 100 μ M de lovastatine et *C* 2 et 20mM de thymidine. Les noyaux ont ensuite été extraits, colorés au bromure d'éthidium et analysés par cytofluorimétrie sur un appareil FACScan. Les écarts représentent la moyenne, \pm l'écart type et p, la valeur significative (test de Student)

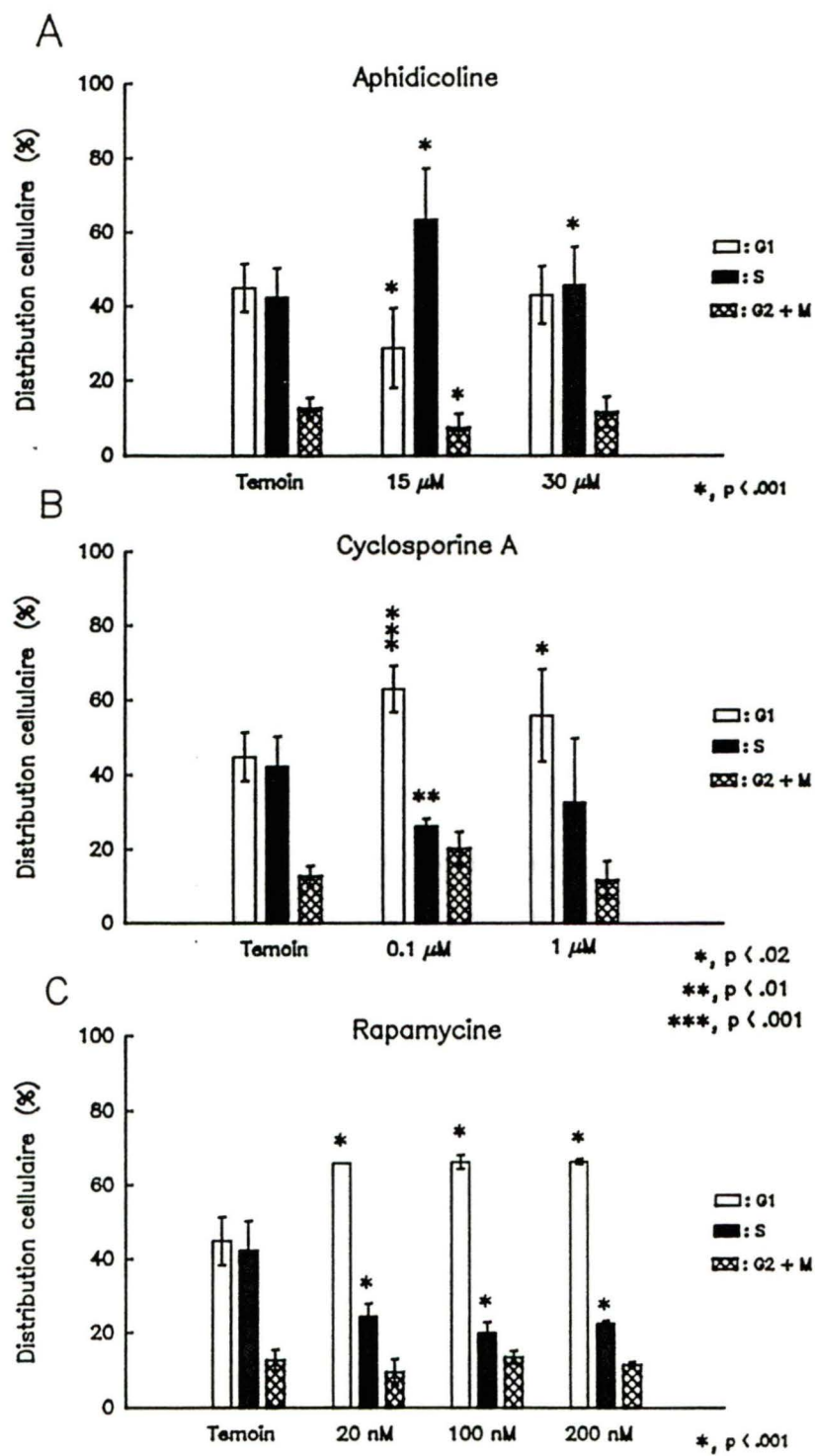


3.1.2.2 Effets des drogues bloquant en phase S

Les effets de trois drogues ont été étudiés, l'aphidicoline (Nasheuer et coll., 1991), la cyclosporine (Schreiber et Crabtree, 1992) et la rapamycine (Price et coll., 1992). Les résultats de cytofluorimétrie sont illustrés à la figure 11. Les effets de ces drogues sont comparés avec des cellules Jurkat n'ayant subi aucun traitement. L'aphidicoline induit un grand nombre de cellules à se partitionner en phase S. Par exemple, des différences majeures sont observées quand la drogue est utilisée à une concentration de 15 μM ($63.5 \pm 13.9\%$) et à 30 μM ($45.7 \pm 10.4\%$). D'autres différences ont été seulement observées en phase G1 ($28.8 \pm 10.7\%$) et en phase G2/M ($7.5 \pm 3.8\%$) quand 15 μM d'aphidicoline est utilisée (Figure 11A).

L'utilisation d'immunosuppresseurs tels la cyclosporine A et la rapamycine, a amené des résultats inattendus (Figure 11B et 11C). Par exemple, les deux drogues semblent induire l'arrêt cellulaire en phase G1/S plutôt qu'en phase S précoce amenant ainsi une accumulation des cellules en phase G1. Dans la cas de la cyclosporine A, aux concentrations 0.1 et 1 μM , la majorité des cellules se retrouvent en phase G1 ($63.0 \pm 6.2\%$ et $56 \pm 12.3\%$ respectivement). Aucune différence statistique n'a été notée entre ces deux concentrations de drogue. Des résultats similaires sont observés en utilisant trois concentrations de rapamycine (10nM, 66.0%; 100nM, $66.4 \pm 1.9\%$ et 1 μM , $66.5 \pm 0.7\%$, respectivement), sans qu'aucune différence statistique entre ces concentrations ne soient observées. Des différences ont par contre été notées pour la phase S

Figure 11: Pourcentage de distribution des lymphocytes Jurkat E.6.1 dans les phases du cycle cellulaire tel que déterminer par analyses cytofluorimétriques. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml) ont été incubées pendant 24 heures avec, *A* 15 et $30 \mu\text{M}$ d'aphidicoline, *B* 0,1 et $1 \mu\text{M}$ de cyclosporine A et *C* 20, 100 et 200nM de rapamycine. Les noyaux ont ensuite été extraits, colorés au bromure d'éthidium et analysés par cytofluorimétrie sur un appareil FACScan. Les écarts représentent la moyenne, \pm l'écart-type et p, la valeur significative (test de Student).



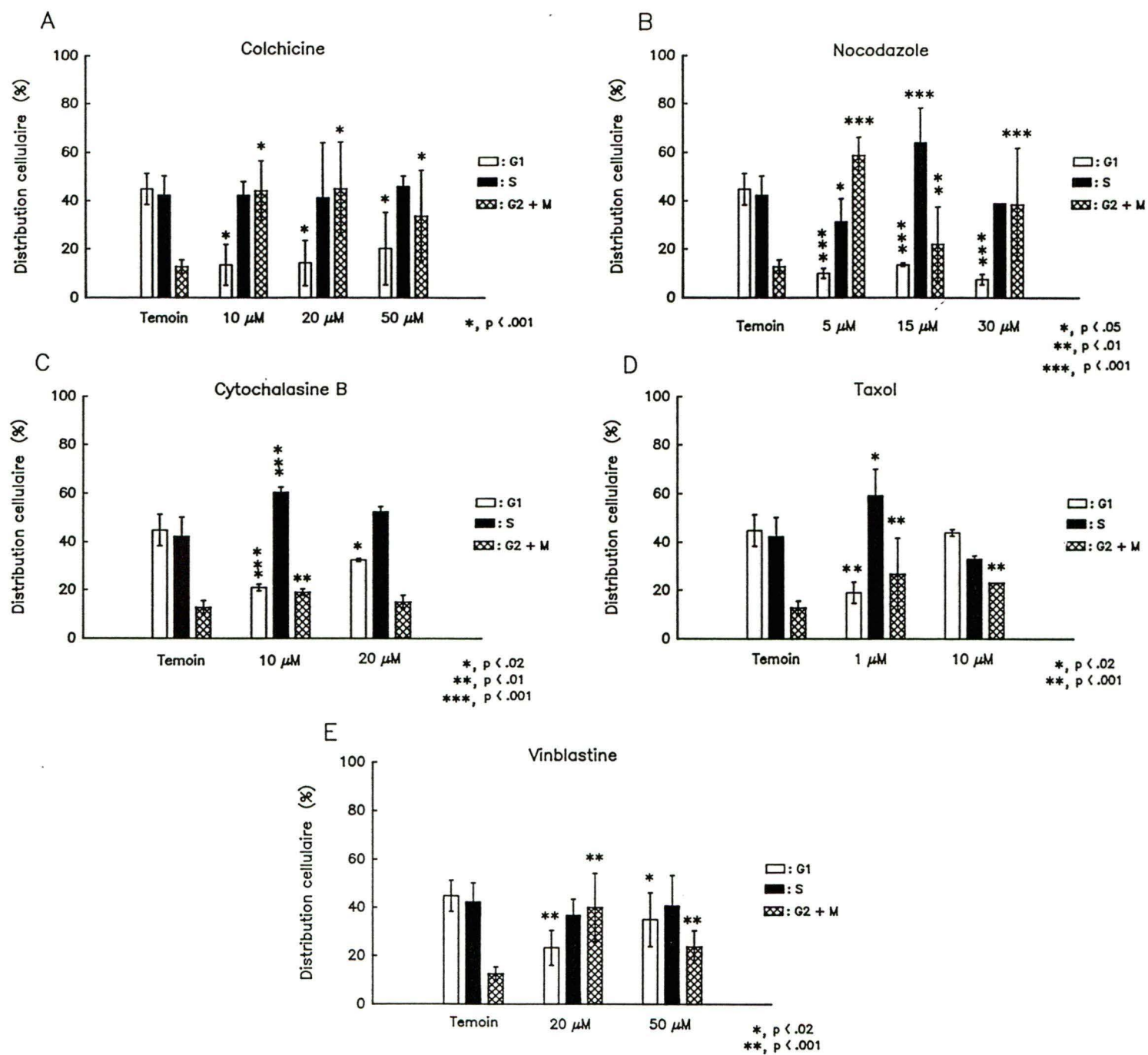
en utilisant $0.1\mu\text{M}$ de cyclosporine A ($26.2 \pm 2.1\%$) et aux trois concentrations de rapamycine employées ($24.5 \pm 3.5\%$, $20.0 \pm 2.9\%$ et $22.5 \pm 0.7\%$).

3.1.2.3 Effets des drogues bloquant en phase G2/M

Nous avons également vérifié l'effet de drogues agissant sur le cytosquelette soient la colchicine, la vinblastine, le nocodazole, la cytochalasine B et le taxol. Les résultats sont indiqués en figure 12 et sont comparés aux cellules non traitées. Dans le cas des trois concentrations de colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules (Darnell et coll., 1986), il y a une distribution plus élevée en phase G2/M ($44.2 \pm 12.4\%$, $45.0 \pm 19.3\%$ et $33.7 \pm 19.0\%$ respectivement) sans différences significatives entre les diverses concentrations. L'augmentation de la distribution en phase G2/M est accompagnée d'une diminution significative dans le pourcentage de cellules en phase G1 ($13.5 \pm 8.4\%$, $14.3 \pm 9.3\%$ et $20.3 \pm 15.0\%$, respectivement) sans qu'aucune concentration de drogue soit plus efficace qu'une autre. La colchicine n'affecte pas le pourcentage de cellules en phase S (Figure 12A).

Des observations similaires ont été notées lorsqu'on utilise une drogue qui a la même cible que la colchicine soit le nocodazole (Figure 12B). Cette drogue augmente le pourcentage de cellules en phase G2/M aux trois concentrations utilisées. Il semble que la concentration la plus efficace soit $5\mu\text{M}$ où $58.7 \pm 7.5\%$ des cellules sont arrêtées en phase G2/M par rapport à $22.0 \pm 15.6\%$ et $38.5 \pm 23.3\%$ en phase G2/M en

Figure 12: Pourcentage de distribution des lymphocytes Jurkat E.6.1 dans les phases du cycle cellulaire tel que déterminer par analyses cytofluorimétriques. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml) ont été incubées pendant 24 heures avec *A* 10, 20 et $50 \mu\text{M}$ de colchicine *B* 5, 15 et $30 \mu\text{M}$ de nocodazole *C* 10 et $20 \mu\text{M}$ de cytochalasine *B* *D* 1 et $10 \mu\text{M}$ de taxol et *E* 20 et $50 \mu\text{M}$ de vinblastine. Les noyaux ont ensuite été extraits, colorés au bromure d'éthidium et analysés par cytofluorimétrie sur un appareil FACScan. Les écarts représentent la moyenne, \pm l'écart-type et p, la valeur significative (test de Student).



présence de $15\mu\text{M}$ et $30\mu\text{M}$ de nocodazole respectivement. De même, cette drogue réduit le pourcentage de cellules en phase S quand une concentration de $5\mu\text{M}$ est utilisée ($31.3 \pm 9.7\%$) mais augmente la distribution cellulaire ($64.0 \pm 14.1\%$) quand $15\mu\text{M}$ est utilisée. Aucune différence n'a été notée dans le cas du nocodazole utilisé à une concentration de $30\mu\text{M}$. Dans le cas de chacune des trois concentrations, on note une diminution significative de la distribution cellulaire en phase G1 ($10.0 \pm 2\%$, $13 \pm 0.7\%$ et $7.5 \pm 2.1\%$, respectivement).

La cytochalasine B, un inhibiteur de la polymérisation des microfilaments (Darnell et coll., 1986), ne s'est pas avérée très efficace pour arrêter les cellules Jurkat en phase G2/M. Par contre, à une concentration de $10\mu\text{M}$, nous avons obtenu $19.0 \pm 1.4\%$ ce qui est plus élevé que ce que nous obtenons pour les cellules non traitées (Figure 12C). A cette même concentration, la drogue augmente le pourcentage de cellules en phase S ($60.5 \pm 2.1\%$) mais pas lorsque $20\mu\text{M}$ est utilisée. Il y a une réduction significative des cellules en phase G1 pour une concentration de $10\mu\text{M}$ ($21.0 \pm 1.4\%$) ou à une concentration de $20\mu\text{M}$, $32.5 \pm 0.7\%$).

Le taxol, un stabilisateur du réseau microtubulaire (Allan et Vale, 1991), agit sur les cellules Jurkat de façon similaire à la cytochalasine B (Figure 12D). Le taxol augmente le pourcentage des cellules dans la phase G2/M quand il est utilisé à une concentration de $1\mu\text{M}$ ($26.7 \pm 15.1\%$) ou à une concentration de $10\mu\text{M}$ (23.0%). Aucune différence significative n'a été notée pour ces deux concentrations. Comme on

l'observe dans le cas du nocodazole, le taxol augmente significativement le nombre de cellules en phase S ($54.3 \pm 10.8\%$) à la concentration de $1\mu\text{M}$. On peut également noter une diminution des cellules en phase G1 ($19.0 \pm 4.4\%$).

La vinblastine, un inhibiteur de la polymérisation des microfilaments (Darnell et coll., 1986), produit des effets semblables à la colchicine. Par exemple, la vinblastine augmente le pourcentage de cellules en phase G2/M. Aucune différence particulière n'est notée entre $20\mu\text{M}$ ($40.0 \pm 14.2\%$) ou à $50\mu\text{M}$ ($23.7 \pm 6.7\%$) (figure 12E). La présence de vinblastine n'altère pas la distribution en phase S mais diminue le pourcentage de cellules en phase G1 aux deux concentrations ($20\mu\text{M}$, $23.3 \pm 7.2\%$; $50\mu\text{M}$, $35.0 \pm 11.2\%$).

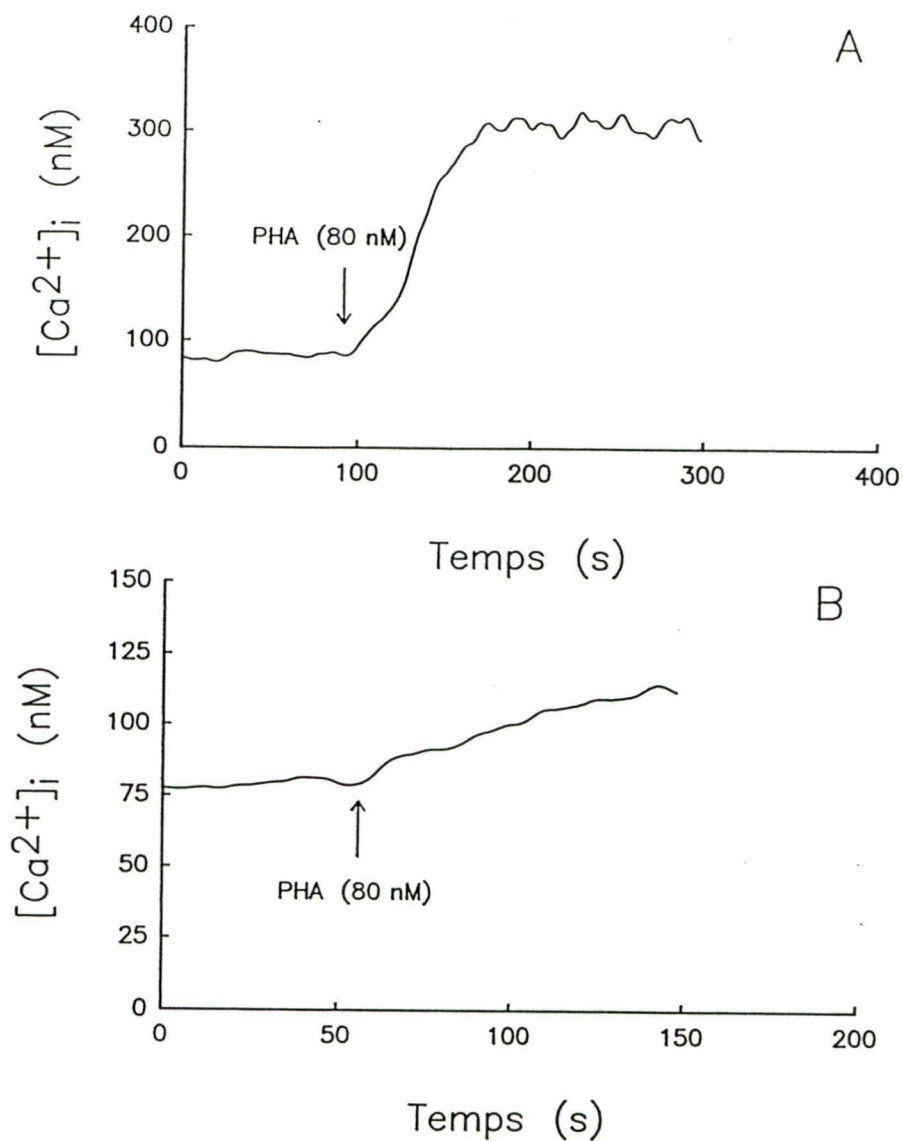
3.1.3 Etude de la mobilisation du calcium chez des populations de lymphocytes Jurkat partiellement synchronisées

Malgré que l'arrêt du cycle cellulaire par l'utilisation de drogues bloquant spécifiquement à divers endroits du cycle, ne se soit pas avéré très efficace, nous avons quand même décidé de faire des études de mobilisation de calcium sur des populations lymphocytes Jurkat E.6.1 partiellement synchronisées.

Nous avons étudié la réponse calcique chez les lymphocytes Jurkat traités avec les divers agents cytostatiques et avons comparé les résultats avec des lymphocytes

Jurkat témoins. Les expériences ont été faites le même jour afin de tenir compte également de la distribution des cellules dans leur cycle. La figure 13A montre un exemple du profil obtenu par cytofluorimétrie et par enregistrement continu de la concentration de calcium intracellulaire en réponse à la stimulation par la PHA (80nM). Dans cet exemple, la distribution des cellules témoins était de 57% en phase G1, 35% en phase S et 7 % en phase G2/M. Ces lymphocytes présentaient un niveau de base de calcium intracellulaire de 86nM, lequel a augmenté à une valeur de 400nM en réponse à la lectine. En comparaison, à la figure 13B, les cellules traitées à la colchicine (20 μ M) présentait un niveau initial de calcium intracellulaire de 40nM et une faible élévation atteignant une valeur de 71nM après ajout de PHA (80nM).

Dans le cas d'expériences faites en utilisant les drogues qui sont relativement efficaces pour accroître la distribution cellulaire en phase G1/S, soient la lovastatine, l'hydroxyurée et la thymidine, la réponse calcique a été différente de l'exemple mentionné ci-avant (Tableau 2). En effet, lorsque les lymphocytes ont été stimulés par la PHA, les valeurs d'augmentation de calcium intracellulaire se comparent au témoin (hydroxyurée, 277 nM; lovastatine, 242 nM; thymidine, 284 nM). Par contre, dans le cas des drogues qui agissent au niveau du cytosquelette pour bloquer les cellules en phase G2/M (taxol, nocodazole et cytochalasine B), les augmentations de calcium ont été beaucoup plus faibles que celles du témoin (témoin, 400nM, taxol, 109 nM; nocodazole, 123 nM; cytochalasine B, 133 nM).



78

Figure 13: Tracé montrant l'augmentation de calcium intracellulaire chez les cellules Jurkat E.6.1 (A) et chez des cellules Jurkat E.6.1 traitées à la colchicine (B) suite à l'activation par la PHA. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml) ont été chargées en fura2-AM ($3 \mu M$) pendant 1 heure à la température de la pièce, lavées et la fluorescence a été déterminée de façon continue à $37^\circ C$. Les cellules ont été stimulées par addition de la PHA (80 nM). Le pourcentage de distribution des lymphocytes Jurkat E.6.1 dans les phases du cycle cellulaire est de 57% en phase G1; 35% en phase S et 7% en phase G2/M pour les cellules témoins, et 22% en phase G1; 16% en phase S et 62% en phase G2/M pour les cellules traitées à la colchicine ($20 \mu M$).

Dans le cas de l'aphidicoline, laquelle provoque un enrichissement plus élevé en phase S par rapport au témoin, celle-ci augmente la réponse calcique suite à la stimulation par la PHA (412 nM). Le tableau 2 présente les résultats des études de calcium chez les cellules Jurkat partiellement synchronisées.

Tableau 2: Effets de la stimulation par la PHA sur la mobilisation du calcium intracellulaire chez des populations de cellules Jurkat partiellement synchronisées. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml) traitées pendant 24 heures avec les différentes drogues ont été lavées deux fois avec le milieu d'incubation, chargées en fura2-AM ($3 \mu\text{M}$) pendant 1 heure à la température de la pièce, lavées 3 fois avec le milieu d'incubation et la fluorescence a été déterminée de façon continue à 37°C . Les cellules ont été stimulées par la PHA (80nM). Les résultats indiquent la distribution cellulaire, les concentrations initiales et finales de calcium ainsi que la différence obtenue suite à l'addition de la PHA.

Droque	Concentration	Distribution %			Ca ²⁺ initial	Ca ²⁺ final	Variation calcique
		G1	S	G2/M			
témoin	-	57	35	7	86nM	400nM	314nM
lovastatine	25µM	36	49	14	87nM	329nM	242nM
hydroxyurée	100mM	37	56	7	76nM	353nM	277nM
thymidine	40mM	54	40	5	93nM	377nM	284nM
aphidicoline	10µg/ml	39	54	7	136nM	547nM	411nM
colchicine	20µM	22	16	62	40nM	71nM	31nM
taxol	2µM	8	46	46	68nM	177nM	109nM
cytochalasine	10µg/ml	32	51	17	57nM	190nM	133nM
nocodazole	5µg/ml	8	42	50	116nM	239nM	123nM

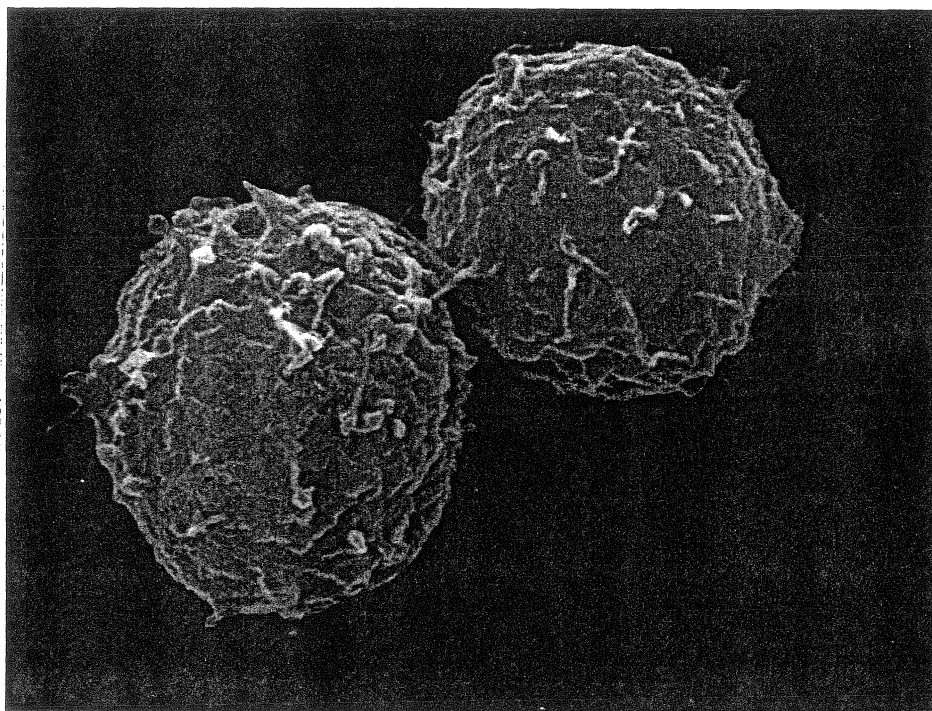
3.1.4 Microscopie électronique à balayage de cellules traitées à la colchicine

L'effet de la colchicine sur la morphologie des cellules Jurkat E.6.1 a été étudié. Les cellules ont été préparées comme indiqué à la section 2.2.8 afin de vérifier si la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, a un effet sur la morphologie des lymphocytes Jurkat. Les cellules ont été traitées à différents temps avec de la colchicine ($10\mu\text{M}$) et les résultats sont montrés à la figure 14.

Les lymphocytes témoins Jurkat apparaissent comme des sphères de diamètre 8-10 μm avec une surface rugueuse d'où projettent des filipodes (Figure 14A) qui ressemblent aux lymphocytes caractéristiques de la maladie de la leucémie athymique ("hairy cell leukemia") (Harrison, 1991). Certaines cellules présentaient des pseudopodes qui semblaient fixer les cellules à la surface de la lamelle (non illustré).

Dans le cas des cellules Jurkat traitées à la colchicine, des différences morphologiques sont déjà évidentes après une heure de traitement (Figure 14B). Des protubérances ("blebs") apparaissent de façon asymétrique donnant un aspect irrégulier aux lymphocytes. De plus, on constate que les cellules traitées ont une apparence beaucoup plus lisses que les cellules témoins (figure 14A).

A



5 μ m

Figure 14: Etudes de microscopie électronique à balayage de cellules Jurkat traitées à la colchicine. Les cellules Jurkat, 5×10^6 cellules/ml, ont été traitées *A* 0 heure (témoin), *B* 1 heure, *C* 2.5 heures, *D* 3 heures et *E* 24 heures, avec de la colchicine 10μ M. Les cellules ont été fixées à des lamelles, lavées et déshydratées avant d'être déposées sur des supports en aluminium pour observation.

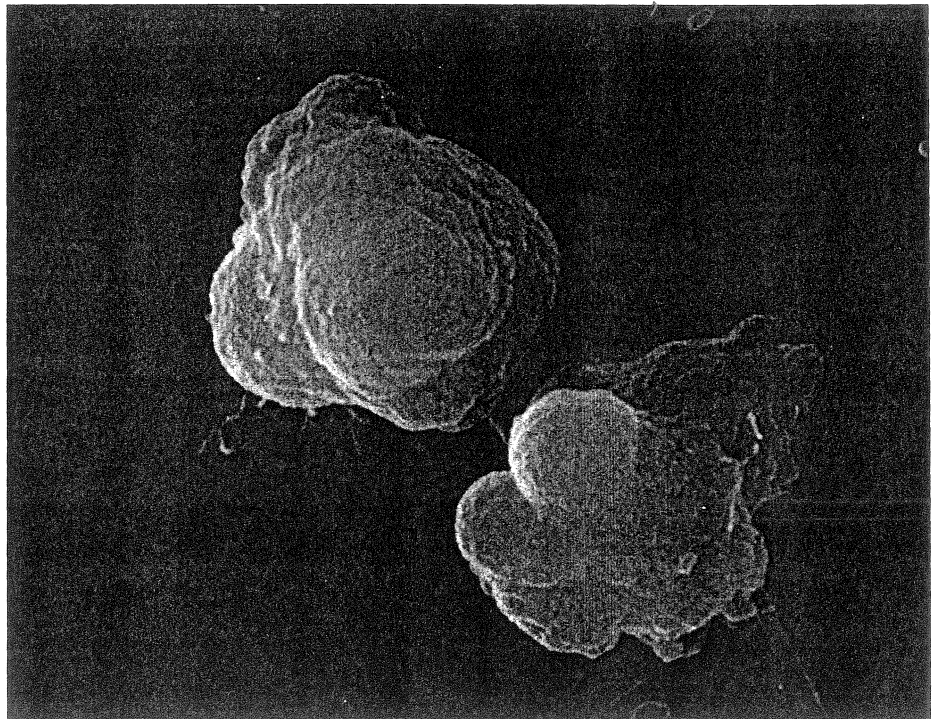
Figure 14 suite...

B



5 μ m

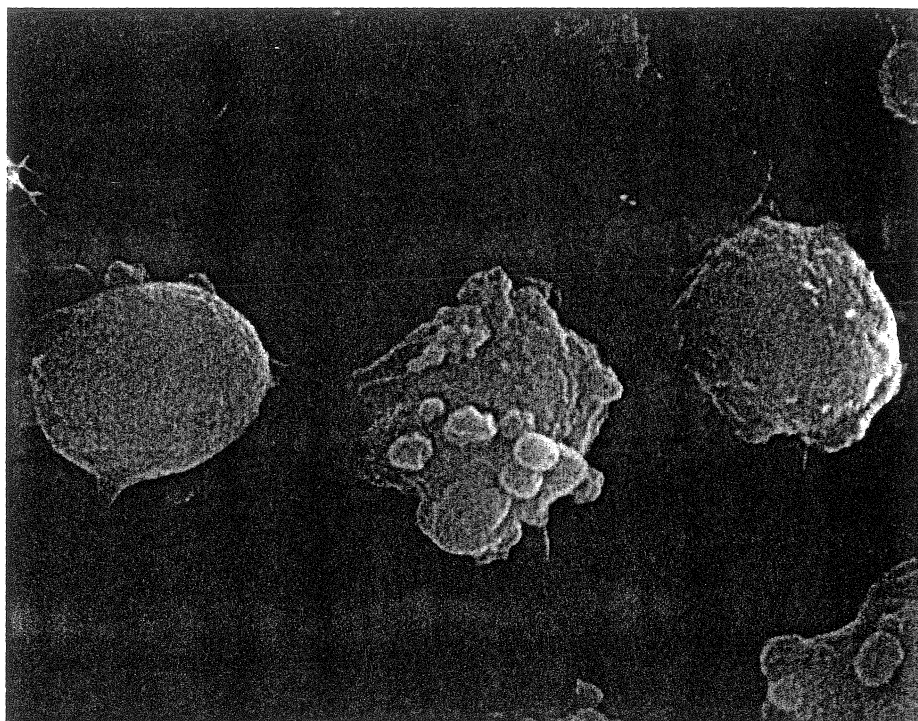
C



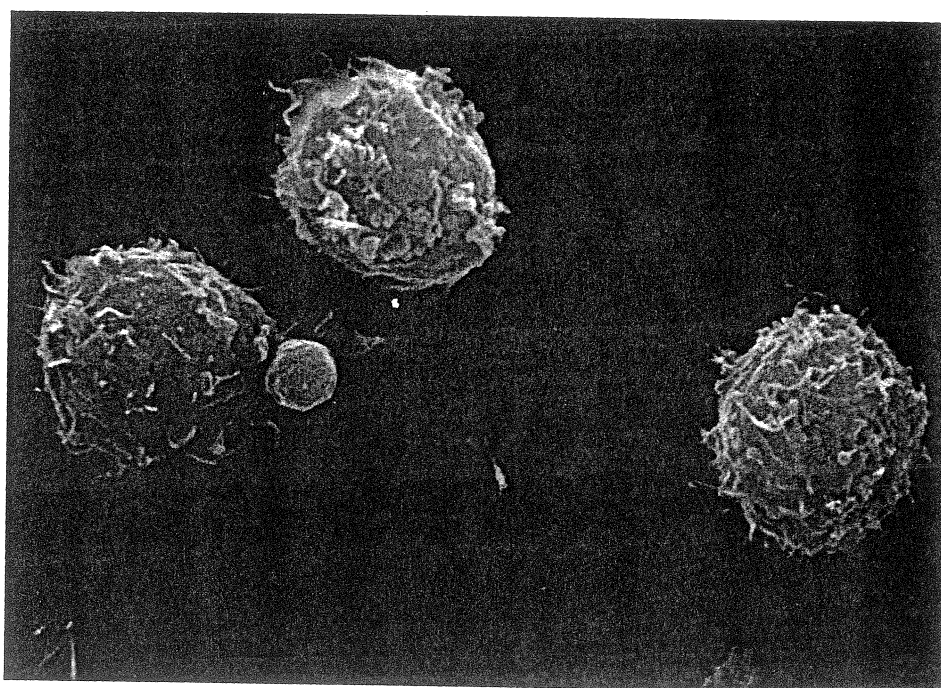
5 μ m

Figure 14 suite

D



E



Les changements morphologiques observés suite au traitement des cellules par la colchicine semblent être réversibles, tel qu'illustré aux figures 14C, 14D et 14E. En effet, après 2.5 heures de traitement avec la drogue (présence continue), la majorité des lymphocytes reprennent leur forme sphérique originale, un processus qui semble être presque complet trois heures après addition de la drogue (Figure 14D). L'ensemble de ces résultats suggère que les lymphocytes Jurkat possèdent une résistance intrinsèque envers les différents agents cytostatiques utilisés dans la présente étude.

Les cellules traitées pendant 1, 2 1/2 et 3 heures avec la colchicine $10\mu\text{M}$ (figure 14B, C et D) montrent, par rapport aux cellules témoins (figure 14A) et aux cellules traitées pendant 24 heures (figure 14E), l'apparition de bulles appelées excroissance bulbeuses présentes dès le début du traitement. Ces excroissances auraient un rôle dans la pinocytose et dans l'apport liquide de la cellule. Initialement, on a cru que ces excroissances étaient dues à des défauts de préparation des cellules pour la microscopie électronique mais en comparant le témoin avec les cellules traitées, on constate que ce n'est pas un artefact.

3.2 Mise en évidence de la P-glycoprotéine

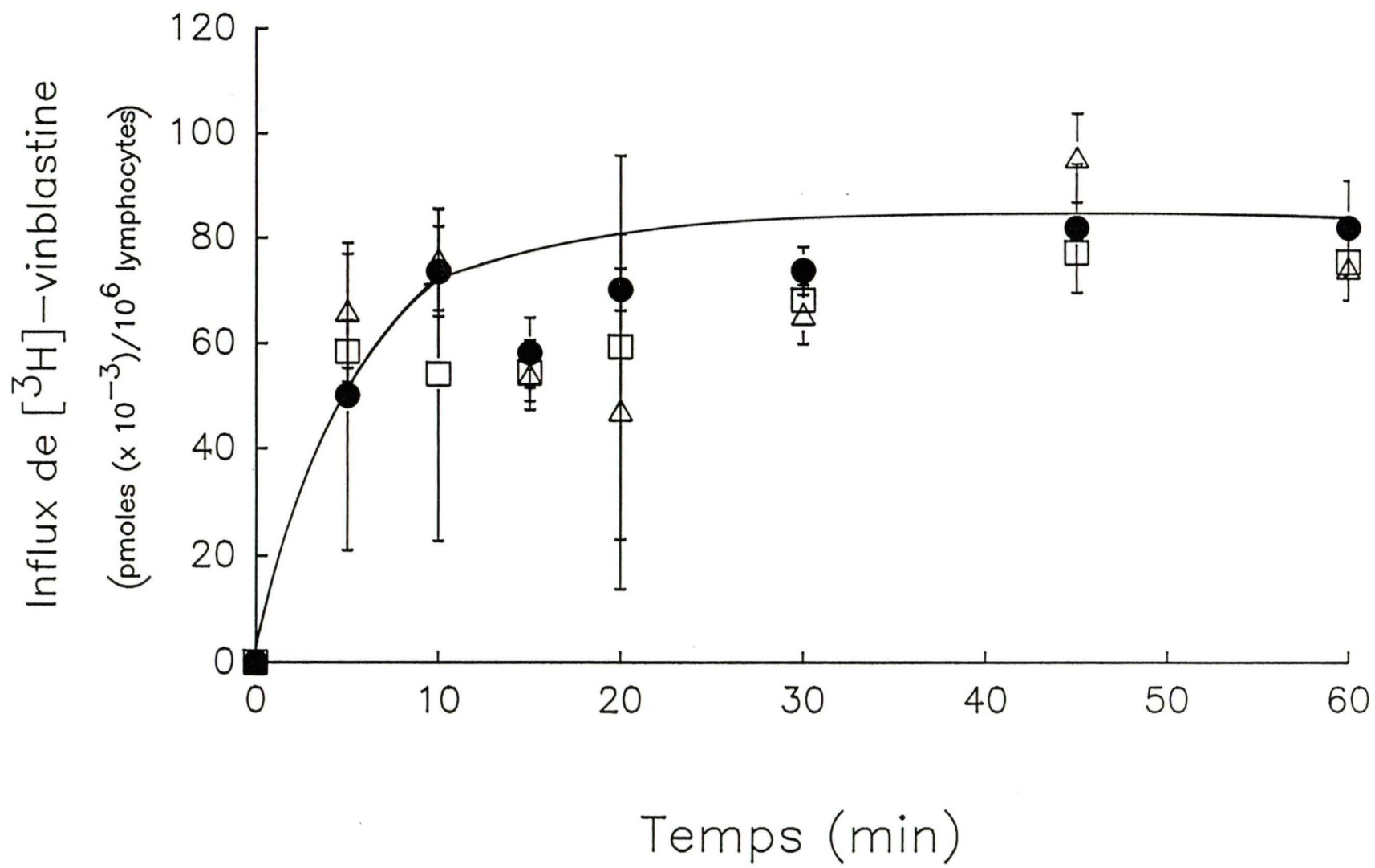
Les expériences mentionnées dans les sections précédentes ont montré un manque d'efficacité des diverses drogues à induire un enrichissement de la distribution des lymphocytes dans des phases précises du cycle cellulaire de même que la

réversibilité du processus de modifications morphologiques induites par un agent déstabilisateur des microfilaments. Nous avons donc émis l'hypothèse que puisque les lymphocytes Jurkat E.6.1 présentent une résistance aux divers agents cytostatiques, celle-ci pourrait être le résultat de l'expression de la P-glycoprotéine. Nous avons donc entrepris des études dans le but de vérifier cette hypothèse.

3.2.1 Etudes d'influx et d'efflux de la vinblastine tritiée

Afin de vérifier la présence de la P-glycoprotéine chez le lymphocyte Jurkat, nous avons procédé à des études d'influx et d'efflux de la vinblastine tritiée. Ces expériences avaient pour objectif de montrer que la P-glycoprotéine est active et impliquée dans l'efflux de la drogue. Les expériences ont été réalisées sous trois conditions différentes. La première condition impliquait des cellules Jurkat E.6.1 témoins, la deuxième des cellules Jurkat E.6.1 mises en présence de vérapamil, un compétiteur de la vinblastine pour le site de liaison des drogues à la P-glycoprotéine (Willigham et coll., 1986) et la troisième des cellules Jurkat E.6.1 où on a diminué les niveaux d'ATP intracellulaire en inhibant la glycolyse (addition de déoxyglucose) et la phosphorylation oxydative (ajout de NaN_3). La figure 15 représente la courbe d'influx de la vinblastine en fonction du temps. Comme la P-glycoprotéine n'est pas impliquée dans l'entrée des drogues, celle-ci se faisant par un processus de diffusion, on s'attendait à ce que les courbes des trois conditions donnent des résultats où l'influx de la vinblastine tritiée montre des variantes dans les trois conditions d'expérimentation.

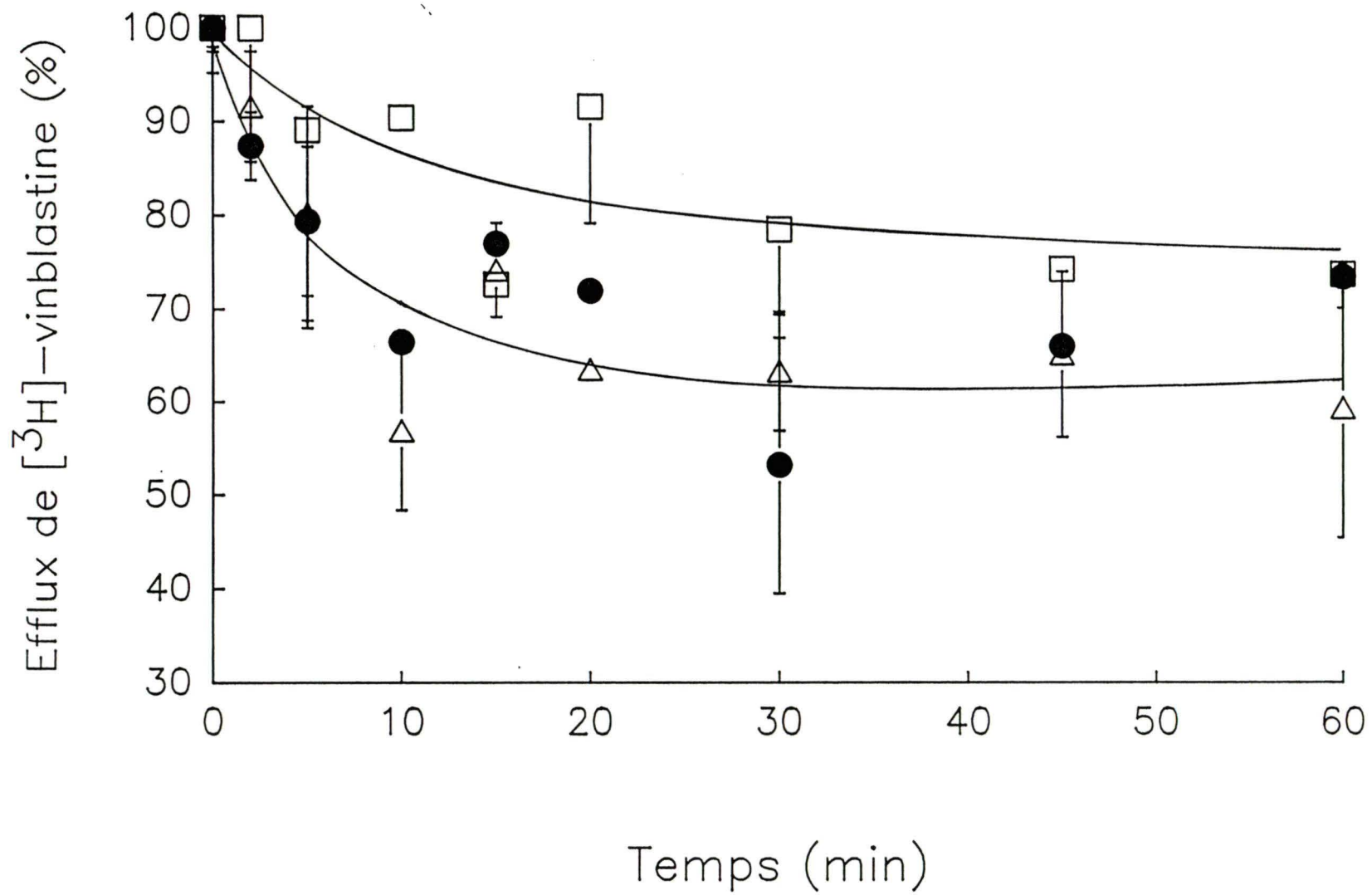
Figure 15: Mesure d'influx de la vinblastine tritiée chez les cellules Jurkat E.6.1 en fonction du temps. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml de RPMI 1640/Hepes) ont été distribuées dans des plaques de 96 puits à raison de 200 000 cellules/puits. Par la suite, $2 \mu\text{M}$ de vinblastine tritiée ont été ajoutées. Selon les cas, du vérapamil ($9 \mu\text{M}$) et du NaN_3 (10mM)/2-déoxy-D-glucose (2g/l) ont été ajoutées. A différents temps, la réaction a été arrêtée par ajout de $400 \mu\text{l}$ d'une solution 1% BSA/PBS froide. Les cellules ont été lavées et la radioactivité incorporée a été comptée. Les cercles pleins correspondent au témoin, les triangles correspondent aux cellules traitées au vérapamil et les carrés, aux expériences faites en présence de NaN_3 et de 2-déoxy-D-glucose.



La courbe d'incorporation de vinblastine tritiée chez les cellules témoins est d'allure hyperbolique. On constate que l'influx de la vinblastine tritiée est plus importante dans les premières minutes d'incubation atteignant un plateau entre 45 et 60 minutes d'incorporation. Les cellules mises en présence de vérapamil et de NaN_3 ont donné les mêmes résultats d'influx de vinblastine tritiée.

La figure 16 illustre les résultats des expériences d'efflux de la vinblastine tritiée. On note des différences qui montrent que l'efflux de la vinblastine tritiée, dans le cas des cellules témoins, a lieu très rapidement au début et ralenti après 30 minutes, pour également atteindre un plateau. Par contre, les cellules mises en présence de NaN_3 et de 2-déoxy-D-glucose expulsent la vinblastine de façon beaucoup plus lente que les cellules témoins suggérant que l'ATP influence l'efflux de la drogue. Dans le cas de l'expérience impliquant le vérapamil, un compétiteur de la P-glycoprotéine, la cinétique de l'efflux de la drogue se fait de la même façon que les cellules témoins.

Figure 16: Mesure d'efflux de la vinblastine tritiée chez les cellules Jurkat E.6.1 en fonction du temps. Les cellules Jurkat (5×10^6 cellules/ml de RPMI/Hepes) ont été distribuées dans des plaques de 96 puits à raison de 200 000 cellules/puits. Par la suite, $2 \mu\text{M}$ de vinblastine tritiée ont été ajoutées. Selon les cas, le vérapamil ($9 \mu\text{M}$) et du NaN_3 ($10 \text{mM}/2\text{-déoxy-D-glucose}$) ont été ajoutées pour une période de 60 minutes. La réaction a été arrêtée par addition de $400 \mu\text{l}$ d'une solution de 1% BSA/PBS froide et les cellules ont été lavées deux fois avec cette solution. Les lymphocytes ont ensuite été placés dans du milieu frais et à différents temps, les cellules ont été lavées, le culot a été lysé par addition de 1% SDS et la radioactivité a été comptée. Les cercles pleins correspondent aux cellules témoins, les triangles correspondent aux cellules traitées au vérapamil et les carrés correspondent aux cellules en absence d'ATP.



3.2.2 Isolement du plasmide contenant le gène MDR

L'isolement du plasmide, contenu dans une souche de *E. coli*, a été effectué selon le protocole décrit dans la section 2.2.9.1. Cette étape s'est avérée efficace et le plasmide a pu être isolé en grande quantité (25 μ g). Le plasmide a pu par la suite être digéré selon les conditions recommandées par le fournisseur pour générer un fragment de 4.1Kb, lequel représente la totalité du gène MDR1 de foie humain (Lincke et coll., 1990), et a permis de préparer une sonde pour la mise en évidence de l'ARN correspondant au MDR1.

3.2.3 Isolement d'ARN des cellules Jurkat E.6.1

La préparation d'ARN a été effectuée selon la technique de Chomczynski et Sacchi (1987) décrite dans la section 2.2.9.4. Les deux bandes correspondant aux unités ribosomales 28S et 18S a permis de conclure sur l'homogénéité de la préparation (résultats non montrés).

3.2.4 Analyse Northern

L'analyse Northern a été effectuée dans les conditions indiquées aux sections 2.2.9.5 à 2.2.9.7. La figure 17 montre la présence d'une bande d'environ 4.5Kb. Cette valeur est compatible avec la présence de l'ARNm du gène MDR dans les lymphocytes T Jurkat.



4.5 kb

Figure 17: Résultat d'analyse de type Northern du gène MDR1 chez les cellules Jurkat

E.6.1. L'ARN des cellules Jurkat a été isolé et transféré sur une membrane de nylon et hybridée avec l'ADNc marquée au ^{32}P codant pour le gène MDR1 de foie humain. La membrane a ensuite été lavée et la détection a été effectuée pendant 24 heures à -70°C sur des films XAR de la compagnie Kodak.

3.3 Etudes des divers réservoirs de calcium intracellulaire

La mobilisation du calcium est un événement nécessaire et essentiel du processus de l'activation des lymphocytes. Cependant, la nature des réservoirs de calcium, leur fonctionnement ou leur localisation demeurent l'objet d'études intensives (Gill, 1992). Il est probable que certains réservoirs calciques, sinon tous, soient localisés au niveau du réticulum endoplasmique, possiblement dans des régions spécialisées qui pourraient être les calciosomes (Volpe et coll., 1987). Chez le lymphocyte, la calréticuline est probablement le réservoir principal de calcium (Michalak et coll., 1992). Des travaux de Guse et collaborateurs (1993) ont montré qu'il existe au moins quatre autres réservoirs calciques chez le lymphocyte Jurkat. Cependant, l'influence mutuelle de chacun de ces réservoirs n'a pas été établie. Dans le but d'étudier les interactions entre les divers réservoirs calciques chez le lymphocyte Jurkat, nous avons utilisé deux méthodologies, la perméabilisation des lymphocytes Jurkat et des microsomes provenant de cellules entières.

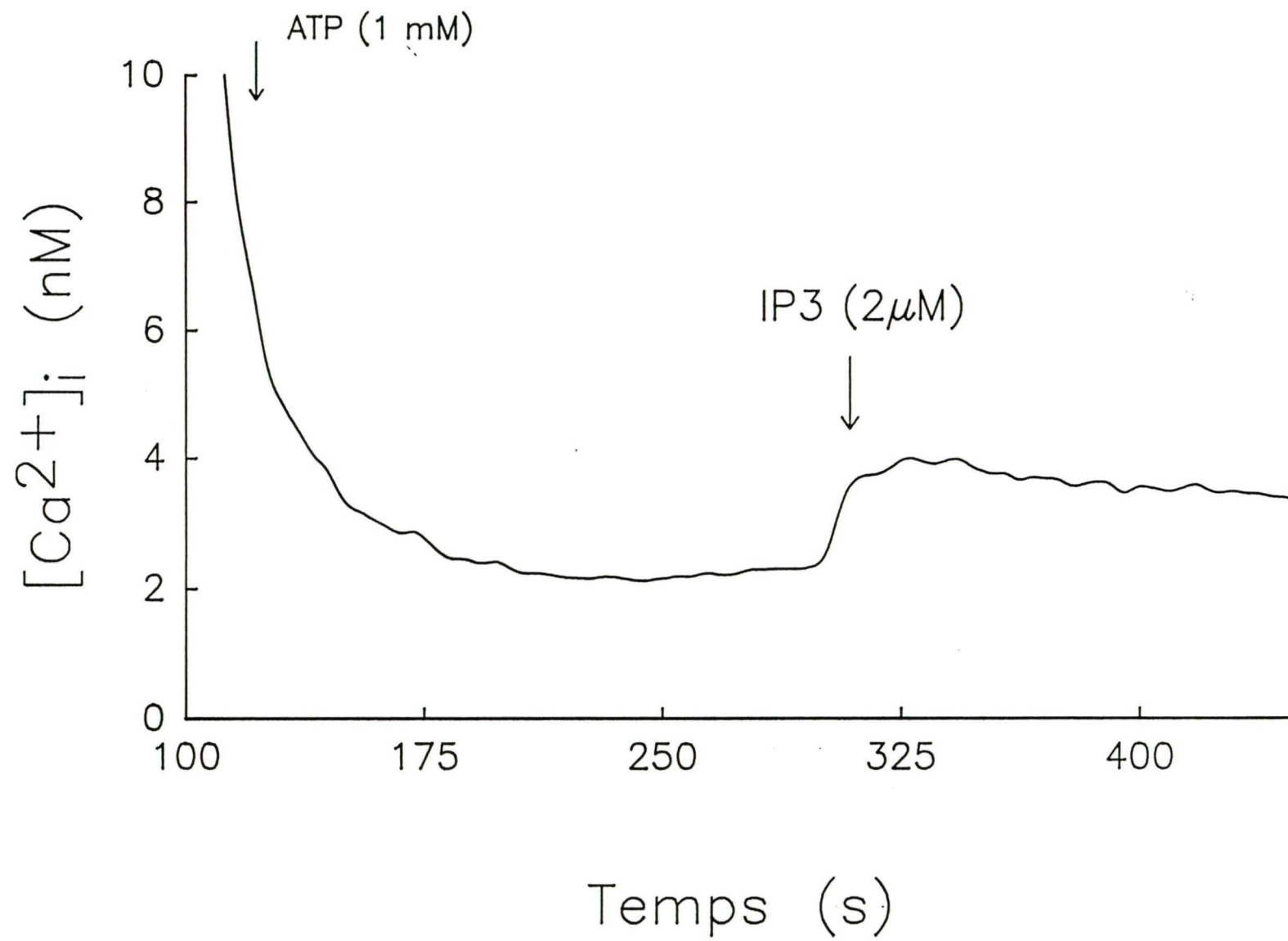
Des travaux de notre laboratoire ont montré l'évidence de la présence d'un réservoir calcique sensible à la ryanodine (Martel et coll., non publié) et à la caféine (Ricard et coll., non publié). De même, des études en cellule unitaire ont permis l'observation d'oscillations calciques chez les lymphocytes Jurkat E.6.1 (Payet et coll., 1991) en réponse à l'une ou l'autre de ces substances. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse que les phénomènes oscillatoires de calcium pourraient être le résultat de

la présence d'un mécanisme CICR.

3.3.1 Isolement des microsomes

Les microsomes, préparés comme indiqué à la section 2.2.12, ont été analysés par spectrofluorimétrie en utilisant le Fura2 comme sonde. Un des résultats est illustré à la figure 18. Initialement, les microsomes en présence de fura acide ($3\mu\text{M}$) a permis de détecter une fluorescence de base. Lorsqu'on ajoute un système de génération d'ATP (créatine kinase, 20U/ml; phosphocréatine, 20mM, ATP, 1mM), on constate une baisse de fluorescence qui suggère que l'ATP généré a été utilisé par les Ca^{2+} -ATPases présentes au niveau du réticulum endoplasmique pour pomper du calcium à l'intérieur de celui-ci. Par la suite, nous avons ajouté $2\mu\text{M}$ d'IP3 ce qui a résulté en une augmentation de fluorescence. Sur le graphique, l'ajout d'IP3 permet une libération de calcium qui ne peut être reproduite par une seconde addition d'IP3. L'ajout d'ionomycine ($2\mu\text{M}$) permet de libérer tout le calcium des réservoirs.

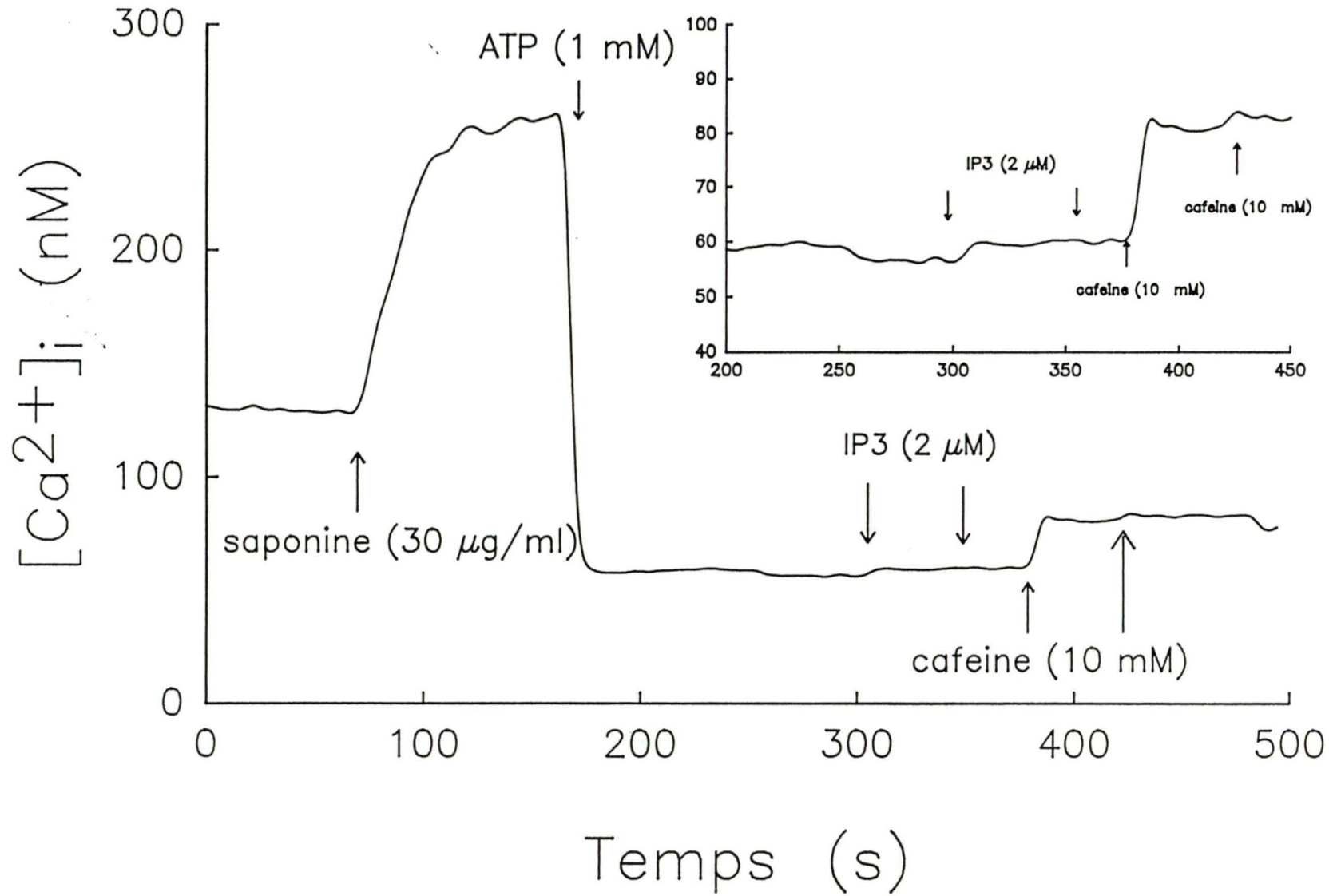
Figure 18: Variation de la concentration de calcium cytosolique suite à la stimulation par l'IP3 chez des préparations de microsomes de cellules Jurkat E.6.1. Les microsomes ont été obtenus par centrifugation et transférés dans une cuvette thermostatée à 37°C. Le Fura2 a été utilisé pour détecter les niveaux de calcium et successivement un système de génération d'ATP, 2 μ M d'IP3 et 2 μ M d'ionomycine ont été ajoutés.



3.3.2 Perméabilisation cellulaire

La perméabilisation cellulaire a été utilisée pour permettre l'étude des divers réservoirs de calcium présents chez les Jurkat E.6.1. Cette technique permet d'utiliser des substances perforant la membrane plasmique ce qui donne accès au réticulum endoplasmique directement. Ces substances, dont la saponine, forment des pores soit en se liant au cholestérol ou en formant des complexes hexamériques dans la membrane plasmique. Ainsi, nous avons préparé les lymphocytes comme décrit à la section 2.2.13 et nous avons fait les études de mobilisation du calcium selon le même principe que les microsomes. La figure 19 illustre un exemple de la perméabilisation des cellules Jurkat avec 30 μ g/ml de saponine. Une fois la perméabilisation effectuée, telle qu'observée par une augmentation de fluorescence où le calcium présent à l'intérieur de la cellule devient accessible au fura2, nous avons ajouté un système de génération d'ATP. On remarque à ce moment une diminution de fluorescence résultant du pompage de calcium probablement à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Par la suite, on a ajouté de l'IP3 (2 μ M) ce qui permet une faible mobilisation du calcium du réservoir sensible à l'IP3. Une autre addition d'IP3 n'a pas induite une réponse de calcium. Afin de vérifier la présence d'un réservoir impliqué dans le mécanisme CICR, nous avons ajouté de la caféine (10mM) ce qui a produit une mobilisation de calcium, d'un réservoir autre que celui de l'IP3. Un deuxième ajout de caféine n'a pas permis une mobilisation supplémentaire. La calibration a été faite par l'addition d'ionomycine (2 μ M), de calcium (1mM) suivi de MnSO₄ (2mM).

Figure 19: Variation de la concentration de calcium cytosolique suite à la stimulation par l'IP3 chez des cellules Jurkat E.6.1 perméabilisées. Les cellules Jurkat perméabilisées avec 30 μ g/ml de saponine pendant 5 minutes à 37°C, en présence de 100mM d'EGTA et 100mM de DTT ont été lavées et transférées dans une cuvette thermostatée à 37°C. Le fura2 a été utilisé pour détecter les niveaux de calcium. L'addition d'un système de génération d'ATP a été faite, suivie de 2 μ M d'IP3 et 10mM de caféine. La calibration du système a été réalisée par addition d'ionomycine (2 μ M), de CaCl₂ (1mM) suivi de MnSO₄ (2mM). En médaillon se trouve la région entre 200 et 450 secondes.



3.3.3 Essai d'isolement du récepteur à la ryanodine

La présence d'un réservoir calcique sensible à la ryanodine a été démontrée chez les cellules Jurkats E.6.1 (Martel et coll., non publié). Basé sur ce fait, nous avons tenté d'isoler le récepteur à la ryanodine chez ces cellules. Nous avons d'abord procédé à la lyse cellulaire selon le protocole indiqué à la section 2.2.14.1. L'homogénat a été centrifugé pour se débarrasser des mitochondries, des cellules non lysées et des noyaux. Par la suite, nous avons concentré les échantillons avant de les séparer sur un gradient de sucrose linéaire 5 à 20%. De ce gradient ont été recueillis 4 échantillons sur lesquels ont été faites les études de liaison.

3.3.3.1 Essai de mise en évidence du récepteur non purifié

Les études de liaison ont été effectuées sur les quatres échantillons selon le protocole décrit à la section 2.2.14.2. Les résultats de cette étude (non illustrés) n'ont montré aucune donnée significative. Nous avons donc purifié les échantillons sur colonne d'héparine-agarose (Sigma, St-Louis, MO).

3.3.3.2 Essai de mise en évidence du récepteur purifié

La chromatographie des échantillons FR3 et FR4 sur une colonne d'héparine-agarose a été faite, les échantillons concentrés, et les études de liaison réalisées. Les

FRACTION	TOTAL	LIAISON NON-SPECIFIQUE	LIAISON SPECIFIQUE	TEST DE STUDENT
FR3 (0.1M)	122± 11cpm	120± 12cpm	0cpm	-
FR3 (0.25M)	194± 7cpm	110± 10cpm	80cpm	p<.001
FR3 (0.5M)	138± 1cpm	99± 13cpm	38cpm	p<.01
FR3 (0.8M)	146± 72cpm	111± 35cpm	35cpm	-
FR4 (0.1M)	138± 11cpm	163± 2cpm	0cpm	-
FR4 (0.25M)	118± 17cpm	120± 17cpm	0cpm	-
FR4 (0.5M)	107± 5cpm	112± 13cpm	0cpm	-
FR4 (0.8M)	131± 10cpm	111± 45cpm	0cpm	-

Tableau 3: Etudes de liaison de la ryanodine tritiée à des fractions microsomales purifiées de lymphocytes Jurkat E.6.1. Les microsomes de lymphocytes Jurkat E.6.1 obtenus par cavitation à l'azote ont été dilués pour obtenir 100µg de protéines par tube, dilués dans un tampon de liaison (1M NaCl, 0.1mM EGTA, 0.15mM CaCl₂, 20mM MOPS pH 7.4, 5mM ATP.Na, 2mM DTT. De la ryanodine tritiée (20nM) a été ajoutée aux tubes pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, 1µM à 10µM de ryanodine non marquée a été ajoutée, ou un volume égal de tampon de liaison, pour déterminer la liaison spécifique et non spécifique, respectivement. Un volume égal de polyéthylène glycol 8000 20% a été ajouté pour permettre la précipitation. Les échantillons ont été filtrés et comptés.

résultats obtenus (Tableau 3), ont montré de la liaison spécifique dans la fraction 3, une valeur significative selon le test de Student. Cette fraction a été utilisée pour des analyses de type Western.

3.3.3.3 Analyses de type Western

Les analyses de type Western ont été effectuées comme décrit à la section 2.2.14.3. Suite à l'obtention de l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le récepteur à la ryanodine squelettique, nous avons procédé aux analyses de type Western en présence de l'échantillon provenant de la FR3. Des échantillons du récepteur à la ryanodine de muscle squelettique et cardiaque de lapin ont été obtenus pour servir de témoin. Les résultats obtenus se sont avérés négatifs en ce qui concerne les échantillons purifiés du récepteur à la ryanodine des cellules Jurkat. Par contre, les échantillons de muscle squelettique et cardiaque de lapin ont montré des bandes positives correspondent en taille au récepteur à la ryanodine. La bande détectée dans le cas du récepteur cardiaque est de plus faible masse moléculaire que la bande obtenue de l'échantillon squelettique.

4. DISCUSSION

4.1 La synchronisation cellulaire

Une revue de la littérature montre qu'hormis le travail de Lohrmann et collaborateurs (1974), il n'y a pas eu d'études effectuées chez le lymphocyte T dans le but d'établir une relation entre les phénomènes de l'activation et les phases du cycle cellulaire. Nous nous sommes donc adressés à cette question en utilisant la lignée de lymphocytes Jurkat E.6.1 originalement obtenus d'un patient souffrant de leucémie (Schneider et coll., 1977), d'une part, et une série de drogues qui agissent à divers endroits du cycle cellulaire. Plusieurs d'entre elles, comme par exemple le taxol et la vinblastine, sont utilisées pour inhiber la progression de tumeurs lors de traitements chimiothérapeutiques. Jusqu'à aujourd'hui, seul le taxol permet la régression de la tumeur sans l'inconfort des effets secondaires (Bogdan et Ding, 1992).

L'utilisation de diverses drogues *in vitro* a fait l'objet d'expériences de synchronisation chez plusieurs types cellulaires. Le groupe de Keyomarsi et collaborateurs (1991) a montré que la lovastatine est très efficace (plus de 95%) pour synchroniser un éventail de types cellulaires dont les cellules Hela et les cellules impliquées dans le cancer du sein humain, les MCF-7. Les travaux de Lohrmann et collaborateurs (1974) ont montré qu'il est possible de complètement synchroniser des lymphocytes de chien par l'utilisation d'hydroxyurée tel que mesurée par incorporation

de thymidine tritiée. Cette incorporation atteint un maximum à 4 heures et représente la phase S, où la thymidine est importante lors de la synthèse de l'ADN.

Dans la première partie de ce travail, nous avons utilisé divers agents cytostatiques dans le but de synchroniser les cellules Jurkat E.6.1. Les résultats ont montré que les lymphocytes T mis en présence de lovastatine pendant 24 heures ne sont pas synchronisés tel qu'analysés par l'incorporation de thymidine tritiée. En fait, aucun maximum d'incorporation n'a été observé, contrairement aux lymphocytes de chien (Lorhmann et coll., 1974). Ce profil d'incorporation n'a non plus été observé chez les lymphocytes Jurkat par essai de synchronisation en présence d'hydroxyurée.

La proportion relative de distribution dans le cycle cellulaire des lymphocytes T Jurkat traités avec divers agents cytostatiques a été déterminée par des analyses de cytofluorimétrie.

Dans le cas des drogues bloquant en phase G1 (hydroxyurée, lovastatine et thymidine), aucune d'entre elles n'a permis d'atteindre un enrichissement supérieur à 60%. Par contre, on a observé un changement dans le patron de distribution des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées par le fait que celles traitées à l'hydroxyurée (50mM) ont montré un enrichissement en phase S (52.5%). Ceci laisse supposer que l'hydroxyurée a un effet partiel sur la synchronisation des lymphocytes Jurkat.

L'utilisation de drogues agissant à la phase S n'a pas permis d'obtenir un enrichissement suffisant en cette phase. Seule l'aphidicoline a induit une synchronisation partielle des cellules en phase S (15 μ M, 63.5%; 30 μ M, 45.7%). Cette drogue est la seule, dans toutes les expériences effectuées, à avoir arrêté 90% et plus des lymphocytes Jurkat E.6.1 en phase S mais ce résultat n'a été obtenu qu'une fois. Les deux autres drogues utilisées, la cyclosporine A et la rapamycine, n'ont pas permis un enrichissement des cellules en phase S. La distribution des cellules suite à un traitement à la cyclosporine A et à la rapamycine a donné une distribution cellulaire comparable avec celle obtenue dans le cas des cellules témoins.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus lorsque les drogues agissant au niveau de la phase G2/M ont été utilisées. Puisque le cytosquelette est nécessaire à la division cellulaire, et que la majorité des drogues utilisées en chimiothérapie agissent au niveau des composantes du cytosquelette, on devait s'attendre à ce que l'utilisation de ces drogues permette d'obtenir de meilleurs résultats en terme de synchronisation. Des cinq drogues utilisées, les plus efficaces ont été le nocodazole (5 μ M), la colchicine (10 μ M, 20 μ M et 50 μ M) et la vinblastine (20 μ M). En fait, la colchicine a permis d'obtenir jusqu'à 60% de cellules en phase G2/M. Des résultats du même ordre ont été obtenus dans le cas de la vinblastine et du nocodazole. Par contre, des résultats décevants ont été observés lors de l'utilisation du taxol. Cette substance, isolée de l'if, un conifère de la Colombie Britannique et de l'Oregon, induit un état statique du cytosquelette. On s'attendait à ce que le taxol permette un enrichissement

adéquat des cellules en phase G2/M mais le meilleur résultat obtenu a été de 30%. La cytochalasine B n'a pas non plus permis la synchronisation des lymphocytes T Jurkat.

Ainsi, la synchronisation cellulaire par l'utilisation d'une variété d'agents cytostatiques n'a pas été un succès, malgré les nombreuses conditions d'expérimentation tentées. En fait, des combinaisons de deux ou plusieurs drogues, par exemple la colchicine en combinaison avec la vinblastine, ont été essayées afin d'améliorer le pourcentage d'enrichissement en phase G2/M (30-40%). Des milieux de culture sans sérum et sans méthionine ont été utilisés pour ralentir la progression des cellules dans le cycle cellulaire mais sans amélioration notable des résultats. La méthionine étant le premier acide aminé traduit (codon d'initiation), une diminution de la méthionine devrait arrêter les cellules en phase S (Darnell et coll., 1986). Les résultats obtenus en absence de méthionine et de sérum ont donné des résultats comparables avec ceux des cellules témoin. Cet appauvrissement du milieu de culture ainsi qu'une surdose de drogues avaient souvent un effet cytotoxique.

Nos objectifs initiaux n'ont pu être atteints. Malgré cela, nous avons quand même procédé à des études de mobilisation de calcium chez des populations lymphocytaires partiellement synchronisées.

4.2 Etude de mobilisation de calcium chez des populations de lymphocytes Jurkat partiellement synchronisées.

Le calcium intracellulaire joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire. Plusieurs groupes ont montré que la stimulation de cellules quiescentes avec des facteurs de croissance provoque une élévation de calcium intracellulaire (Rabinovitch et coll., 1986; Vincentini et Villereal, 1986). Seul le groupe de Wahl et Gruenstein (1993) a été intéressé par la relation du cycle cellulaire avec le calcium. Leurs études chez des cellules GM2987 (fibroblastes humains) ont montré que l'entrée des cellules en phase S était dépendante du calcium cytosolique. En effet, la diminution du calcium cytosolique par l'exposition à du diméthyl BAPTA empêche la progression dans le cycle cellulaire. Si par la suite, les cellules GM2987 sont mises en présence d'ionomycine, un ionophore du calcium, l'inhibition de la synthèse d'ADN est supprimée dans les 24 heures suivantes, suggérant que le calcium cytosolique est très important lors de la phase S.

Cette relation calcium-cycle cellulaire a été vérifiée chez les lymphocytes Jurkat E.6.1. En fait, les cellules Jurkat traitées avec différentes drogues ont donné des résultats intéressants (Tableau 2). Le traitement avec de la colchicine ($20\mu\text{M}$) a permis un enrichissement de 62% des cellules en phase G2/M. Parallèlement, un échantillon de ces mêmes cellules a été utilisé pour des études de mobilisation du calcium. Les résultats ont montré une variation de calcium intracellulaire suite à une stimulation à

la PHA (80nM) de 31nM, ce qui est 10 fois plus faible que des cellules témoins n'ayant subi aucun traitement. La lovastatine (25 μ M) a induit un enrichissement de 49% en phase S et une variation de calcium intracellulaire de 242nM ce qui est comparable au témoin suite à l'exposition à la PHA. Des résultats semblables ont été obtenus dans le cas de l'hydroxyurée (100mM) qui a généré une variation de 277nM.

Les résultats obtenus à partir des expériences de mobilisation de calcium chez des populations cellulaires partiellement synchronisées (Tableau 2) suggèrent que le calcium est nécessaire lors des phases G1 et S, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Wahl et Gruenstein (1993). En fait, on constate que les cellules enrichies dans les phases G1 et S mobilisent du calcium de façon comparable aux cellules témoins. Par contre, les cellules enrichies en phase G2/M montrent une mobilisation du calcium très faible ce qui suggère que la traduction du signal d'activation dans ces phases, si elle est présente, ne peut induire une relâche de calcium cytosolique.

4.3 Microscopie électronique à balayage

L'impossibilité de synchroniser les cellules au-delà de 60% dans les différentes phases du cycle cellulaire avec les différentes drogues utilisées a suscité beaucoup d'interrogations, dont la possibilité de l'absence d'un effet des drogues sur les cellules Jurkat. Il est connu que la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, a un effet direct sur le cytosquelette (Goldman, 1971). Cette observation

a été utilisée afin de vérifier si la colchicine ($10\mu\text{M}$) a un effet sur la morphologie des lymphocytes Jurkat E.6.1 et ainsi d'obtenir des données appuyant celles obtenues par les études de cytofluorimétrie.

La colchicine affecte la morphologie du cytosquelette des cellules dès les premières heures de traitement. Chez les cellules non traitées, on constate deux motifs de surface prédominants. Le premier est celui des microvillis qui sont des projections en forme de doigts impliqués dans les régions de la membrane plasmique où se trouvent des récepteurs spécifiques (Burger, 1971) et qui sont aussi impliqués dans le transport d'éléments nutritifs. Les microvillis ne se retrouvent que chez des cellules transformées (Burger, 1971). Le deuxième motif est la présence de filipodes qui sont des tentacules permettant l'attachement des cellules aux surfaces. Des études ont montré que les filipodes deviennent plus abondantes en phase G2 tardive chez des cellules transformées. Il a été montré également qu'ils contiennent des microtubules orientés de façon parallèle tout au long de leurs structures (Taylor, 1966).

Lorsque les cellules Jurkat E.6.1 ont été traitées à la colchicine pendant 1, 2 1/2 et 3 heures, un motif supplémentaire apparaît, les excroissances bulbeuses ("zeiotic blebs") (figure 15). Ces protubérances sont généralement présentes à la surface cellulaire, de plusieurs types de cellules dont les lymphocytes, durant la phase M et disparaissent en phase G1 précoce (Kessel et Shih, 1974). Ces excroissances ont souvent été mise en doute comme étant des artefacts de préparation. Cette possibilité n'est

probablement pas correcte puisque celles-ci sont absentes chez les cellules Jurkat témoins. Par contre, les microvillis disparaissent ce qui donne une apparence très lisse de la membrane cellulaire. Ces effets disparaissent après 24 heures de traitement où les cellules retrouvent leur morphologie originale.

La disparition des microvillis de la surface cellulaire des lymphocytes Jurkat E.6.1 traitées est difficile à expliquer. Ceci pourrait être dû à l'effet de la colchicine sur le cytosquelette, qui aurait pour effet une désorganisation de ces structures. En fait, les microvillis sont présents à toutes les phases du cycle cellulaire des cellules Hela et des cellules KB (Kessel et Shih, 1974).

Edelman et collaborateurs (1973) ont déjà mentionné un effet de la colchicine sur la morphologie des lymphocytes murins. Ce qui était inattendu était la disparition des effets de la colchicine sur les lymphocytes Jurkat E.6.1 avec le temps. Plusieurs explications sont possibles. Par exemple, les lymphocytes Jurkat E.6.1 auraient pu dégrader la colchicine, ce qui inverserait l'effet de la drogue. Cependant, cette explication est peu probable puisque le catabolisme d'un agent cytotoxique prends au-delà de 3 heures. Ici, après ce temps, l'effet de la drogue commence à disparaître chez les lymphocytes Jurkat E.6.1 (figure 15). Une alternative est celle de l'existence d'un mécanisme de résistance qui fait en sorte que la colchicine est rejetée hors de la cellule.

4.4 Mise en évidence de la P-glycoprotéine

La synchronisation cellulaire des lymphocytes Jurkat E.6.1 via l'utilisation d'agents cytostatiques n'a pu être observée bien que la colchicine affecte la morphologie des cellules Jurkat. Suite à cette observation, nous avons émis l'hypothèse de la présence d'un mécanisme de résistance chez les cellules Jurkat.

Plusieurs mécanismes qui confèrent la résistance cellulaire à divers xénobiotiques sont connus. Par exemple, le cytochrome P450 possède la capacité de métaboliser certaines drogues antitumorales comme le VP-16 (Harris et Hochhauser, 1992) et constitue ainsi un mécanisme de résistance. Une famille d'enzymes, les glutathione-S-transférases, peuvent également métaboliser des xénobiotiques en les conjuguant à la glutathione réduite ce qui les rend plus polaires donc plus facilement excrétables (Clynes, 1993).

Les topoisomérases peuvent aussi être responsables du phénomène de la résistance. Ces enzymes assistent au changement conformationnel lors de la réplication et de la transcription de l'ADN. Certaines drogues peuvent s'insérer dans les brins d'ADN, ce qui gêne l'action des topoisomérases. Il en résulte des dommages permanents de l'ADN et la mort cellulaire (par un mécanisme inconnu) (Bodley et Liu, 1988). Dans certains cas de résistance, il semblerait que les topoisomérases soient insensibles aux drogues.

Le mécanisme de résistance aux drogues le plus étudié est celui de l'expression d'une protéine de 170KD, appelée P-glycoprotéine et qui est codée par les gènes MDR (Ling, 1992). Son rôle physiologique est encore inconnu. Le gène MDR1 humain est localisé sur le chromosome 7q36 (Bell et coll., 1987). Des anticorps monoclonaux dirigés contre la P-glycoprotéine de hamster ont montré une réaction croisée envers la P-glycoprotéine humaine suggérant une homologie entre les espèces. Cette suggestion a été confirmée par le clonage des gènes codant pour une famille de P-glycoprotéine.

Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps et de sondes d'acides nucléiques a montré l'homogénéité de la P-glycoprotéine. En fait, ces études ont montré un taux élevé de P-glycoprotéine dans plusieurs échantillons de tissus cancéreux dont les myélomes, les lymphomes, les neuroblastomes, les sarcomes et les leucémies (Ling, 1992).

Des études de structure ont montré que la Ser⁹³⁹ dans la région transmembranaire TM11 de la P-glycoprotéine est importante pour l'attachement et l'expulsion du substrat. En fait, des études de Kajiji et collaborateurs (1993) et Azzaria et collaborateurs (1989) ont montré qu'une mutation de cette Ser en Phe inhibait complètement l'activité de la P-glycoprotéine. Le groupe de Lou et Clarke (1993) a montré que la mutation de la Pro²²³ (TM4) ou de la Pro⁸⁸⁶ (TM10) réduit l'habilité de la protéine mutante à conférer la résistance à la colchicine, à l'adriamycine ou à l'actinomycine D mais pas à la vinblastine. Ces régions TM4 et TM10 se font face dans la protéine native ce qui suggère un rôle important de ces résidus dans la reconnaissance. Donc, l'hypothèse

d'expulsion non-spécifique des drogues via la P-glycoprotéine est discutable. Des travaux de Ueda et collaborateurs (1992) ont montré que la P-glycoprotéine transporte le cortisol, l'aldostérone et le dexaméthasone mais non la progestérone, ce qui suggère un rôle physiologique dans le transport. Des travaux du groupe de Béliveau et collaborateurs (1993, résultats non publiés) ont montré un rôle important de la P-glycoprotéine dans le transport d'hormones à la barrière hématoencéphalique, ce qui pourrait jouer un rôle dans la différenciation des cellules du cerveau.

Des travaux récents de Cole et collaborateurs (1992) ont montré la présence d'une nouvelle protéine, membre de la superfamille des "ABC proteins", capable d'exercer un mécanisme de résistance, semblable à celui de la P-glycoprotéine. Ces protéines sont appelées MRP pour "Multiple Drug Resistance Associated Protein". Il existe dans la littérature des cas où des types cellulaires sont résistants sans qu'aucun mécanisme connu en soi responsable (Shen et coll., 1991).

Nous avons voulu déterminer si la résistance chez les cellules Jurkat E.6.1 pouvait être le résultat de l'expression du gène MDR (Multiple Drug Resistance), la P-glycoprotéine. L'ARN messager de la P-glycoprotéine a été mis en évidence par des analyses de type Northern à l'aide d'une sonde ADNc codant pour le gène MDR1 de foie humain. Une bande de 4.5Kb a pu être détectée, démontrant la présence du gène MDR1 de foie humain chez les cellules Jurkat E.6.1. Puisque l'hybridation a lieu dans les régions où se trouve l'ARN 28S ribosomal, nous avons vérifié la spécificité du

résultat par l'utilisation d'ARN messager poly A⁺. Le résultat obtenu a été identique (non illustré).

Nous avons également vérifié si la P-glycoprotéine était surexprimée chez les cellules Jurkat traitées pendant 24 heures avec la colchicine (10 μ M). En fait, l'ARN extrait n'a pas montré un niveau de message pour la P-glycoprotéine plus élevé dans le cas de cellules traitées à la colchicine par rapport à des cellules témoins (non illustré). Aucune étude de type Western n'a été faite chez les cellules Jurkat ce qui n'exclut pas que la P-glycoprotéine soit traduit de façon très efficace dans le cas de cellules traitées à la colchicine.

Le mécanisme de résistance des cellules Jurkat semble impliquer la P-glycoprotéine. Par contre, ceci n'exclut pas l'existence d'autres mécanismes de résistance aux xénobiotiques chez les lymphocytes T leucémiques Jurkat.

4.5 Etudes d'influx et d'efflux de la vinblastine tritiée

La présence de la P-glycoprotéine chez les cellules Jurkat devrait faciliter l'élimination d'une drogue radiomarquée. Nous avons vérifié si la vinblastine tritiée était expulsée par les cellules Jurkat. L'activité de la P-glycoprotéine est énergie-dépendante et requiert de l'ATP. De plus, une substance bloquant le pore de la P-glycoprotéine devrait nuire à l'expulsion de la vinblastine tritiée. En fait, le vérapamil

ainsi que la quinidine, sont des drogues bloquant le pore de la P-glycoprotéine ce qui devrait avoir un effet d'inhibition de la résistance (Willingham et coll., 1986). Nous avons donc procédé à des études d'influx et d'efflux de vinblastine tritiée dans des conditions témoins et dans des conditions où le vérapamil était présent et où les niveaux d'ATP étaient faibles. Dans notre étude, l'influx de la vinblastine tritiée s'est avéré être identique dans les trois conditions d'expérimentation, ce qui met en doute la présence de la P-glycoprotéine chez les lymphocytes Jurkat E.6.1. Puisque nous n'avons pas sélectionné les cellules Jurkat pour leur résistance, contrairement à d'autres groupes utilisant des lignées cellulaires (Cole et coll., 1991), ceci peut expliquer la similarité des résultats obtenus dans les trois conditions d'expérimentation.

Des différences ont cependant été notées lorsque nous avons procédé à des études d'efflux de la vinblastine tritiée. Les cellules Jurkat non traitées expulsent rapidement la vinblastine tritiée. Lorsqu'on empêche la formation d'ATP, on a constaté un ralentissement drastique de l'efflux de vinblastine tritiée, probablement le reflet de l'inhibition de la P-glycoprotéine. En présence de vérapamil, des résultats inattendus ont été obtenus. En fait, le vérapamil aurait dû empêcher, en bloquant le pore de la P-glycoprotéine, l'efflux de la vinblastine tritiée. Par contre, les résultats ont montré qu'en présence de vérapamil, l'efflux se produit de la même façon que les cellules non traitées. Ceci s'explique probablement par l'inefficacité du vérapamil probablement dû au fait que nos cellules n'ont pas été sélectionnées. Il a été montré que la résistance due aux topoisomérases n'est pas contournée par la présence de vérapamil (Chabner et

Fojo, 1989), ce qui constitue peut-être un moyen alternatif de résistance chez les cellules Jurkat. De plus, des travaux de Shen et collaborateurs (1991) ont montré que le vérapamil n'inhibe pas le mécanisme de résistance aux xénobiotiques chez les cellules de carcinome humain.

4.6 Etudes des divers réservoirs de calcium chez les cellules Jurkat E.6.1

La présence de réservoirs calciques chez les lymphocytes Jurkat E.6.1, leur localisation et leur nombre l'objet de recherches intensives. Certains auteurs postulent qu'il n'existe qu'un seul réservoir (Meyer et Stryer, 1988), d'autres deux (Dupont et coll., 1991) et d'autres jusqu'à quatre chez les cellules Jurkat (Guse et coll., 1993), ces réservoirs étant une partie intégrante du réticulum endoplasmique.

Guse et collaborateurs (1993) ont identifié quatre réservoirs calciques présents chez les cellules T Jurkat. Un premier réservoir est celui sensible à l'IP3 (réservoir 1). L'anticorps monoclonal, l'OKT3, permet une mobilisation de calcium de ce réservoir sensible à l'IP3. La thapsigargine permet une mobilisation supplémentaire du réservoir à l'IP3 insensible à l'IP3 (réservoir 2). Une fois ces deux premiers réservoirs vidés, la caféine permet la libération de calcium d'un autre réservoir (réservoir 3). Quand ce réservoir ne répond plus à la caféine, une mobilisation finale de calcium peut être accomplie par l'addition d'ionomycine (réservoir 4). Cette dernière libération de calcium correspond à environ 10% de la capacité de stockage chez des cellules

perméabilisées.

Le but de la présente étude était de mettre en évidence le nombre de réservoirs calciques chez les lymphocytes Jurkat E.6.1 et les interactions qui pouvaient exister entre eux. Pour ce faire, des microsomes de cellules Jurkat ainsi que des cellules Jurkat perméabilisées ont été utilisées. Les résultats de la figure 19 montrent qu'il existe un réservoir sensible à l'IP3 chez une préparation de microsomes de lymphocytes Jurkat E.6.1. A la figure 20, on montre qu'il existe ce même réservoir et un autre sensible à la caféine chez des cellules Jurkat E.6.1 perméabilisées. La distinction entre ces deux réservoirs a pu être montrée par le fait que le réservoir sensible à l'IP3 a d'abord été vidé de son contenu en calcium par un deuxième ajout d'IP3. N'ayant pu observer de mobilisation de calcium additionnelle, nous avons supposé que ce réservoir était vide. Ensuite, l'addition de caféine a permis une mobilisation de calcium qui lui provenait d'un deuxième réservoir, sensible à cette substance. Les expériences effectuées ne nous ont pas permis de démontrer que le réservoir sensible à la caféine est le même que le réservoir sensible à la ryanodine.

Nous avons éprouvé beaucoup de difficultés à obtenir des résultats reproductibles. L'explication reste encore inconnue. La première difficulté rencontrée a été la perméabilisation cellulaire. Après utilisation de plusieurs produits perméabilisants (saponine, digitonine, streptolysine-O et α -toxine), à différentes concentrations, la saponine s'est avérée être la plus efficace. En fait, la concentration

utilisée doit permettre la perméabilisation de 95% des cellules sans pour autant endommager les organelles internes. Le deuxième problème a été de faire en sorte que le calcium soit pompé à l'intérieur du réticulum endoplasmique par ajout d'un système de génération d'ATP. L'ATP sert à activer les Ca^{2+} -ATPases présentes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et faire pomper le calcium à l'intérieur. Mis à part les résultats présentés ici, ce phénomène n'a pu être répété. Une explication est que les Ca^{2+} -ATPases sont inhibées par un mécanisme quelconque. L'ajout d'octanol, lorsque l'on relâche la pression de la chambre à rupture pour empêcher la formation de mousse semblerait être un inhibiteur des Ca^{2+} -ATPases (Ma et coll., 1988; Randriamampita et coll., 1991). De plus, des travaux de Khananshvil et collaborateurs (1990) ont montré que la Ca^{2+} -ATPase est inhibée par un seul ion calcium. Suite à ces observations, beaucoup de précautions techniques ont été prises comme la chromatographie de toutes les solutions sur colonne d'agents chélatants (Chelex) et le remisage des solutions a été fait dans des bouteilles de Teflon où beaucoup moins de calcium est libéré que dans des contenants de verre. Malgré tout, il reste environ $10\mu\text{M}$ de calcium contaminant. En cellule unitaire, il a été montré que l'inhibition des Ca^{2+} -ATPases microsomaux provoque des oscillations de calcium (Foskett et Wong, 1992).

Puisque le phénomène de pompage semble être inhibé chez les préparations de microsomes des cellules Jurkat, l'hypothèse que les réservoirs calciques étaient déjà remplis a été émise. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé de la thapsigargine a été faite. La thapsigargine, un sesquiterpène, induit la mobilisation de

calcium intracellulaire en inhibant les Ca^{2+} -ATPases, un mécanisme différent de l'activité des ionophores (Gouy et coll., 1990). Cependant, l'utilisation de thapsigargine chez les lymphocytes Jurkat n'a pas provoqué de mobilisation de calcium, ce qui montre sans équivoque que les réservoirs ne sont pas remplis et qu'il y a un problème dans le remplissage de ceux-ci. Des travaux de Gilchrist et collaborateurs (1992) chez des microsomes préparés de muscle squelettique, ont montré que l'isolement du réticulum endoplasmique dans un tampon sans KCl permettait de garder les réservoirs intacts. Cette approche a été utilisée mais sans succès.

Un troisième problème a été celui de la fluorescence. Les mobilisations calciques sont très petites (30nM), ce qui est difficilement détectable lorsque beaucoup de calcium est présent. Dans plusieurs cas, une très grande fluorescence de base était présente avant même de débiter les études de mobilisation calcique. Nous avons tenté de diminuer cette fluorescence en chélatant le maximum de calcium initialement avec de l'EGTA ce qui n'a pas amélioré les résultats. Le Quin2, un fluorophore beaucoup moins sensible pour le calcium (et aux autres ions bivalents) que le Fura2, a été utilisé, mais sans succès.

Ayant comparé les différences du protocole de Guse et collaborateurs (1993) avec les nôtres (Chow et Jondal, 1990; Chow et coll., 1990; Guse et coll., 1992), et même avec toutes les améliorations apportées (diminution du nombre de cellules, variation du temps de perméabilisation et des tampons, etc.), nous n'avons pu faire d'études

comparatives sur les propriétés des divers réservoirs de calcium chez les cellules Jurkat

E.6.1.

4.7 Mise en évidence du récepteur à la ryanodine chez les cellules Jurkat.

La mise en évidence du récepteur à la ryanodine a été tentée selon les protocoles de Imagawa et collaborateurs (1987) et Lai et collaborateurs (1988). Suite à l'isolement d'une fraction qui aurait dû correspondre au récepteur à la ryanodine purifié, les études de type Western ont été faites au moyen d'un anticorps dirigé contre le récepteur à la ryanodine squelettique de lapin.

Un témoin positif, le récepteur à la ryanodine squelettique de lapin a montré la présence d'une bande d'environ 500KD suite à la détection par la technique de la chemiluminescence. Un autre témoin, le récepteur à la ryanodine cardiaque de lapin, a également montré une bande, de plus faible masse moléculaire. La réactivité croisée du même anticorps pour deux sources différentes du récepteur est discutable. Certains croient (Otsu et coll., 1990) que l'homologie de 66% qui existe entre ces deux récepteurs est suffisante pour mettre en évidence le récepteur cardiaque avec l'anticorps dirigé contre le récepteur squelettique.

Aucune bande réactive n'a pu être détectée dans les fractions purifiées provenant des cellules Jurkat, même en utilisant des conditions variées: différentes concentrations

d'anticorps et des échantillons purifiés, et différents temps d'exposition. Malgré ces résultats négatifs, des réponses calciques suite à l'exposition des cellules Jurkat à la ryanodine ont été observés (résultats non montrés). Ces réponses suggèrent la présence de récepteurs à la ryanodine.

Quelques suggestions peuvent expliquer les résultats négatifs obtenus par les études de type Western. La première explication est celle de la dégradation des échantillons purifiés du récepteur à la ryanodine provenant des cellules Jurkat. En fait, beaucoup de temps s'est écoulé entre le moment de l'obtention des échantillons purifiés et l'acquisition de l'anticorps dirigé contre le récepteur à la ryanodine (3 mois).

Une deuxième explication est celle de la spécificité réduite de l'anticorps de lapin. Cet anticorps polyclonal est dirigé contre le récepteur à la ryanodine squelettique de lapin. Etant donné que nos échantillons proviennent de cellules lymphocytaires humaines et non musculaires, la faible homologie pourrait empêcher toute détection de la présence du récepteur à la ryanodine chez les cellules Jurkat. Des anticorps dirigés contre le récepteur à la ryanodine humain existent mais ne sont pas disponibles (Imagawa et coll., 1987).

Une troisième explication est le nombre de récepteurs à la ryanodine présents chez les cellules Jurkat. Il est connu que les récepteurs à la ryanodine sont peu nombreux dans les muscles. Il se peut que le nombre de récepteur à la ryanodine soit

aussi très faible chez le lymphocyte Jurkat, ce qui en rend sa détection difficile. Une alternative possible pour mettre en évidence ce récepteur chez les lymphocytes Jurkat E.6.1 , serait de traduire l'ARN en ADNc pour ensuite être amplifié par réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) et ainsi procéder à des études de type Southern.

Une dernière explication est l'absence du récepteur à la ryanodine chez les cellules Jurkat. Jusqu'à maintenant, beaucoup de chercheurs ont montré des relâchements de calcium suite à l'addition de ryanodine chez des cellules non musculaires. Personne n'a cependant pu mettre en évidence le récepteur à la ryanodine à partir de ces tissus. Il se pourrait que les mobilisations calciques observées dans nos laboratoires et ailleurs soient dues à l'implication d'un récepteur semblable au récepteur à la ryanodine mais qui ne serait pas suffisamment homologue pour être détecté par un anticorps de source musculaire.

Cette dernière explication est tout de même peu probable étant donné que le genre de réponses obtenues suite à la stimulation ryanodine est retrouvé fréquemment. La solution réside peut-être dans l'étude d'autres régions cellulaires que le réticulum endoplasmique où un récepteur à la ryanodine pourrait être présent.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les Drs Gilles Dupuis et Marcel Daniel Payet pour la chance et la confiance qu'ils m'ont données de travailler au sein de leur équipe. Le Dr. Dupuis, plus particulièrement, a été pour moi d'une grande disponibilité, d'une patience sans borne et a su me rendre le goût de la recherche. Egalement merci au Dr. Payet pour ses conversations critiques et son aide précieuse pour ma formation scientifique.

Je tiens à remercier spécialement le Dr. Marek Rola-Pleszczynski pour m'avoir permis d'utiliser l'appareil de cytofluorimétrie FACScan et les discussions enrichissantes sur la P-glycoprotéine. Merci au Dr. Eric Rousseau pour m'avoir généreusement donné des échantillons d'extraits musculaires cardiaques et squelettiques de lapin pour mes études de mise en évidence du récepteur à la ryanodine chez les Jurkat. Je remercie Pierre Magny pour m'avoir permis de faire des études de microscopie électronique à balayage. Et finalement, ces études de mise en évidence du récepteur n'auraient pu avoir lieu sans l'anticorps anti-ryanodine de muscle squelettique de lapin du Dr. Gerhard Meissner (Chapel Hill, NC) à qui j'adresse mes remerciements.

Je remercie également mes collègues de travail, Nuria Basora, Guylaine Harbec et Isabelle Ricard pour les discussions et l'aide scientifique apportées lors de mes études.

Merci aux Drs. Jean-Pierre Perreault et Marek Rola-Pleszczynski pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je remercie tous les étudiants et le personnel du département de biochimie qui ont contribué à l'ambiance agréable et stimulante. Un merci particulier à William Home pour son aide technique en biologie moléculaire.

Merci à ma famille qui a su m'encourager dans les moments agréables et difficiles et pour leur support.

Enfin, je tiens à remercier la Faculté de Médecine pour m'avoir accordé une bourse d'études.

REFERENCES

- Allan, V.J., Vale, R.D. (1991). Cell cycle control of microtubule-based membrane transport and tubule formation in vitro. *J. Cell Biol.* 113, 347.
- Anderson, K., Lai, F.A., Liu, Q.Y., Rousseau, E., Erickson, H.P., Meissner, G. (1989). Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} release channel complex. *J. Biol. Chem.* 264, 1329.
- Aoudjit, F. (1990). Effets des dihydropyridines et autres modulateurs de l'activité calcique chez le lymphocyte T humain Jurkat E.6.1. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.
- Appleby, M.W., Gross, J.A., Cooke, M.P., Levin, S.D., Qian, X., Perlmutter, R.M. (1992). Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59^{lck}. *Cell* 70, 751.
- Azzaria, M., Schurr, E., Gros, P. (1989). Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the MDR1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5289.
- Bagnasco, M., Nunes, J., Lopez, M., Cerdan, C., Pierres, A., Mawas, C., Olive, D. (1989). T cell activation via the CD2 molecule is associated with protein kinase C translocation from the cytosol to the plasma membrane. *Eur. J. Immunol.* 19, 823.
- Baldari, C.T., Heguy, A., Telford, J.L. (1993). Ras protein activity is essential for T-cell antigen receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 268, 2693.
- Baniyash, M.B., Garcia-Morales, P., Luong, E., Samelson, L.E., Klausner, R.D. (1988). The T cell antigen receptor zeta chain is tyrosine phosphorylated upon activation. *J. Biol. Chem.* 263, 18225.
- Bastin B., Payet, M.D., Dupuis, G. (1990). Effects of modulators of adenylyl cyclase on interleukin-2 production, cytosolic calcium elevation and K^{+} channel activity in Jurkat T cells. *Cell. Immunol.* 128, 385.
- Bell, D.R., Trent, J.M., Willard, H.F. (1987). Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences. *Cancer Genet. Cytogenet.* 25, 141.
- Berridge, M.J. (1990). Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265, 9583.

- Berridge, M.J., Taylor, C.W. (1988). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Cold Spr. Harbor Symp.* 53, 927.
- Berridge, M.J. (1988). Inositol trisphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.(London)* 403, 589.
- Berridge, M.J. (1988). Inositol lipids and calcium signalling. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 234, 359.
- Berridge, M.J., Cobbold, P.H., Cuthbertson, K.S.R. (1988). Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Philos. Trans. Roy. Soc. B.* 320, 325.
- Berridge, M.J., Galione, N.A. (1988). Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.*, 2, 3074.
- Berridge, M.J. (1991). Cytoplasmic calcium oscillations: a two pool model. *Cell Calcium* 12, 63.
- Berridge, M.J. (1990). Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265, 9583.
- Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361, 315.
- Bigelow, D.J., Inesi, G. (1992). Contributions of chemical derivatization and spectroscopic studies to the characterization of the calcium transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 323.
- Bodley, A.L., Liu, L.F. Topoisomerases as novel targets for cancer chemotherapy. *Biotechnol.* 6, 1315.
- Bodgan, C., Ding, A. (1992). Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor α and interleukin-1 in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 52, 119.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 328, 125.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117.
- Brand, A., Gilmour, D.G., Goldstein, G. (1976). Lymphocyte-differentiating

hormone of bursa of Fabricius. *Science* 193, 319.

Brown, J.C., Hunt, R.C. (1978). Lectins. *Int. Rev. Cytol.* 52, 277.

Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33.

Burger, M.M. (1971). The significance of surface structure changes for growth control under crowded conditions. G.E. Wolstenholme and J. Knight (eds). *Ciba Foundation Symposium on Growth Control in Cell Culture*. London-Churchill, Ltd. London.

Burgoyne, R.D., Cheek, T.R., Morgan, A., O'Sullivan, A.J., Moreton, R.B., Berridge, M.J., Mata, A.M., Colyer, J., Lee, A.G., East, J.M. (1989). Distribution of two distinct Ca^{2+} -ATPases-like proteins and their relationships to the agonist-sensitive calcium store in adrenal chromaffin cells. *Nature* 342, 72.

Bustelo, X.R., Ledbetter, J.A., Barbacid, M. (1992). Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* 356, 68.

Campbell, K.P., Knudson, C.M., Imagawa, T., Leung, A.T., Sutko, J.L., Kahl, S.D., Raab, C.R., Madson, L. (1987). Identification and characterization of the high affinity ^3H -ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 262, 6460.

Carafoli, E. (1991). The calcium pumping ATPase of plasma membrane. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 531.

Chabner, B.A., Fojo, A. (1989). Multidrug resistance: P-glycoprotein and its allies- The elusive foes. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 910.

Chan, A.C., Irving, B.A., Weiss, A. (1992). New insights into T cell antigen receptor structure and signal transduction. *Curr. Opin Immunol.* 4, 246.

Chao, T.-S.O., Byron, K.L., Lee, K.-M., Villereal, M., Rosner, M.R. (1992). Activation of MAP kinase by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 267, 19876.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by

acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156.

- Chow, S.C., Jondal, M. (1990). Polyunsaturated free fatty acids stimulate an increased in cytosolic calcium by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool in T cells through a mechanism independent of phosphoinositide turnover. *J. Biol. Chem.* 265, 902.
- Chow, S.C., Ansotegui, I.J., Jondal, M. (1990). Inhibition of receptor-mediated calcium influx in T cells by unsaturated non-esterified fatty acids. *Biochem J.* 267, 727.
- Clynes, M. (1993). Cellular models for multiple drug resistance in cancer. *In vitro. Cell Dev. Biol.* 29A, 171.
- Cobbold, P., Daly, M., Dixon, J., Woods, N. (1989). Repetitive calcium transients in hormone-stimulated cells. *Biochem. Soc. Trans.* 17, 9.
- Cole, S.P., Bharadwaj, G., Gerlach, J.H. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650.
- Cole, S.P. (1991). Multidrug resistance in small cell lung cancer. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, 313.
- Cole, S.P.C., Chanda, E.R., Dicke, F.P., Gerlach, J.H., Mirski, S.E.L. (1991). Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in small cell lung cancer cell line: evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. *Cancer Res.* 51, 3345.
- Coll, R.J., Murphy, A.J. (1992). Fluoride-inhibited calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267, 21584.
- Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1986). Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells. *J. Biol. Chem.* 261, 7921.
- Cornwell, M.M., Pastan, I., Gottesman, M.M. (1987). Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 262, 2166.
- Crabtree, G. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355.

- Cyert, M.S., Kirschner, M.W. (1988). Regulation of MPF activity in vitro. *Cell* 53, 185.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1986). Principles of cellular organization and function. Molecular Cell Biology. Scientific American Books. WH Freeman. New York. p.144.
- Densmore, J.J., Szabo, G., Gray, L.S. (1992). A voltage-gated calcium channel is linked to the antigen receptor in Jurkat T lymphocytes. *FEBS Letters* 312, 161.
- Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S., Cantrell, D.A. (1990). Stimulation of p21 ras upon T-cell activation. *Nature* 346, 719.
- Dupont, G., Goldbeter, A. (1993). One-pool model for Ca^{2+} oscillations involving Ca^{2+} and IP_3 as co-agonists for Ca^{2+} release. *Cell Calcium* 14, 311.
- Dupont, G., Goldbeter, A. (1992). Oscillations and waves of cytosolic calcium: insights from theoretical models. *Bioessays* 14, 485.
- Dupont, G., Berridge, M.J., Goldbeter, A. (1991). Signal-induced Ca^{2+} oscillations: Properties of a model based on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell Calcium* 12, 73.
- Dupuis, G., Bastin, B. (1988). Lectin interactions with the Jurkat leukemic T-cell line: quantitative binding studies and interleukin-2 production. *J. Leukocyte Biol.* 43, 238.
- Dupuis, G., Héroux, J., Payet, M.D. (1989). Characterization of Ca^{2+} and K^+ currents in the human Jurkat T cell line: effects of phytohaemagglutinin. *J. Physiol. (London)*. 412, 135.
- Dupuis, G., Doucet, J.P. (1981). Electrophoretic studies of the protein constituents of pig spleen lymphocyte plasma membrane and of a non-ionic detergent extract of intact cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 669, 157.
- Dupuis, G., Doucet, J-P. (1981). Separation and localization on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels of pig spleen lymphocyte plasma membrane proteins which bind ^{125}I -labelled phytohemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 669, 171.
- Dustin, P. (1984). Microtubules. Springer-Verlag. New York.

- Edelman, G.M., Yahara, I., Wang, J.L. (1973). Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1442.
- Endicott, J.A., Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H., Tonks, N.K. (1991). Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253, 401.
- Fisher, D.B., Mueller, G.D. (1971). Studies on the mechanism by which phytohemmagglutinin rapidly stimulates phospholipid metabolism of human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 248, 434.
- Foskett, J.K., Wong, D. (1992). Calcium oscillations in parotid acinar cells induced by microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibition. *Am. J. Physiol.* 262, C656.
- Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K_b. *Science* 257, 919.
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., Mikoshiba, K. (1989). Primary structure and functional expression of the IP₃-binding protein P400. *Nature*. 342, 32.
- Furuichi, T., Shiota, C., Mikoshiba, K. (1990). Distribution of IP₃ receptor mRNA in mouse tissues. *FEBS Letters* 267, 85.
- Gallagher, R.B., Cambier, J.C. (1990). Signal transmission pathways and lymphocyte function. *Immunol. Today*. 11, 187.
- Gardner, P. (1989). Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 59, 15.
- Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B. (1988). Uptake of extracellular calcium and not recruitment from internal stores is essential for T lymphocyte proliferation. *Eur. J. Immunol.* 18, 917.
- Gelfand, E.W. (1990). Cytosolic calcium changes during T- and B- lymphocyte activation: biological consequences and significance. *Curr. Top. Membr.*

Transp. 35, 153.

- Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Grinstein, S. (1984). Role of membrane potential in the regulation of lectin-induced calcium uptake. *J. Cell. Physiol.* 121, 533.
- Giannini, G., Clementi, E., Ceci, R., Marzali, G., Sorrentino, V. (1992). Expression of a ryanodine receptor- Ca^{2+} channel that is regulated by TGF- β . *Science* 257, 91.
- Gilchrist, J.S.C., Belcastro, A.N., Katz, S. (1992). Intraluminal calcium dependence of calcium and ryanodine-mediated regulation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release. *J. Biol. Chem.* 267, 20850.
- Gill, D.L., Ghosh, T.K., Bian, J., Short, A.D., Waldron, R.T., Rybak, S.L. (1992). Function and organization of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool. P. Greengard and G. A. Robinson (eds). *Adv. Second Messenger Phosphoprot. Res.* New York. Raven Press. vol. 26. p. 265.
- Glick, B., McDuffie, F.C. (1975). Immunoglobulin and the bursa of Fabricius. *J. Reticuloendothelial Soc.* 17, 119.
- Goldbeter, A., Dupont, G., Berridge, M.J. (1990). Minimal model for signal-induced calcium oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1461.
- Goldman, R.D. (1971). The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. *J. Cell. Biol.* 51, 752.
- Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 116.
- Goldstein, I.J., Hugher, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature* 285, 66.
- Goldstein, I.J., Hayes, C.E. (1978). The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127.
- Gottesman, M.M., Pastan, I. (1988). The multidrug transporter; a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* 263, 12163.
- Gouy, H., Cefai, D., Christensen, S.B., Debré, P., Bismuth, G. (1990).

- Ca^{2+} influx in human T lymphocytes is induced independently of inositol phosphate production by mobilization of intracellular Ca^{2+} endoplasmic reticulum-ATPase inhibitor thapsigargin. *Eur. J. Immunol.* 20, 2269.
- Gros, P., Croop, J., Housman, D. (1986). Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47, 371.
- Gros, P., Ben-Neriah, Y., Croop, J., Housman, D. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multiple drug resistance. *Nature* 323, 728.
- Guse, A.H., Roth, E., Emmrich, F. (1993). Intracellular calcium pools in Jurkat T- lymphocytes. *Biochem. J.* 291, 447.
- Guse, A.H., Roth, E., Emmrich, F. (1992). D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate releases calcium from crude microsomes and enriched vesicular plasma membranes, but not from intracellular stores of permeabilized T-lymphocytes and monocytes. *Biochem. J.* 288, 489.
- Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., Imoto, K. (1992). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Letters* 2 et 3, 229.
- Hamada, H., Tsuruo, T. (1988). Characterization of the ATPases activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* 48, 4926.
- Harris, A.L., Hochhauser, D. (1991). Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta. Oncol.* 31, 205.
- Hayes, J.D., Wolf, C.R. (1990). Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* 272, 281.
- Henderson, P.J.F., Maiden, M.C.J. (1987). *Trends Genet.* 3, 62.
- Henderson, J.S., Meissner, G. (1987). Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on calcium and is modulated by magnesium, adenine nucleotide and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 262, 3065.
- Holliday, R. (1990). Genomic imprinting and allelic exclusion. *Devel.* (supplement), 125.

- Igusa, Y., Miyazaki, S., Yamashita, N. (1983). Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. *J. Physiol.* 340, 611.
- Iino, M. (1989). Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig. *J. Gen. Physiol.* 94, 363.
- Imagawa, T., Smith, J.S., Coronado, R., Campbell, K.P. (1987). Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J. Biol. Chem.* 262, 16636.
- Imboden, J.B., Weiss, A., Stobo, J.D. (1985). The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J. Immunol.* 134, 663.
- Imboden, J.B., Stobo, J.D. (1985). Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.* 161, 446.
- Imboden, J.B., Weiss, A. (1987). The T-cell antigen receptor regulates sustained increases in cytoplasmic free Ca^{2+} through extracellular Ca^{2+} influx and ongoing intracellular Ca^{2+} mobilization. *Biochem. J.* 247, 695.
- Imboden, J.B. (1988). The regulation of intracellular signals during lymphocyte activation. *Immunol. Today.* 9, 17.
- Imboden, J.B., Weiss, A. (1988). The initiation of human T lymphocyte activation. *Progr. Allergy.* 42, 246.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takay, Y., Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 252, 7610.
- Inui, M., Saito, A., Fleischer, S. (1987). Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structure. *J. Biol. Chem.* 262, 1740.
- Irvine, R.F. (1991). Inositol tetrakisphosphate as a second messenger: confusions, contradictions and a potential resolution. *Bioessays.* 13, 419.
- Isakov, N., Scholz, W., Altman, A. (1986). Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. *Immunol. Today.* 7, 271.

- Janeway, C.A. (1992). The T cell receptor as a multicomponents signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 645.
- Jorgensen, J., Reay, P.A., Ehrich, E.W., Davis, M.M. (1992). Molecular components of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 835.
- Juliano, R.L., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455, 152.
- June, C.H., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S., Thompson, C.B. (1990). Role of the CD28 receptor in T cell activation. *Immunol. Today* 11, 211.
- Kajiji, S., Talbot, F., Grizzuti, K., Van Dyke-Phillips, V., Agresti, M., Safa, A.R., Gros, P. (1993). Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry* 32, 4185.
- Kanaide, H., Shogakiuchi, Y., Nakamura, M. (1987). The norepinephrine-sensitive calcium storage site differs from the caffeine-sensitive site in vascular smooth muscle of the rat aorta. *FEBS Letters* 214, 130.
- Kartner, N., Ling, V. (1989). Multidrug resistance in cancer. *Scientific American*. Mars 1989, 44.
- Kartner, N., Porelle, D.E., Bradley, G. Ling, V. (1985). Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316, 820.
- Kessel, R.G., Shih, C.Y. (1974). Cells in culture. Scanning electron microscopy in biology. Springer-Verlag, New York. p.63.
- Khananshveli, D., Myung, J., Kolouch, R., Jencks, W.P. (1990). The calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum is inhibited by one calcium ion. *FEBS Letters* 260, 83.
- Khandan, K., Sandoval, L., Band, V., Pardee, A.B. (1991). Synchronisation of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res.* 51, 3602.
- Kikkawa, U., Kishimoto, A., Nishizyka, Y. (1989). The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 31.

- Kimball, J.W. (1990). Introduction to Immunology. Earlier editions. Collier Macmillan. New York-London.
- Klausner, R.D., Samelson, L.E. (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 64, 875.
- Klausner, R.D., O'Shea, J.J., Luong, H., Ross, P., Bluestone, J.A., Samelson, L.E. (1987). T cell antigen receptor tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 262, 12654.
- Knopf, J.L., Lee, M.-H., Sultzman, M.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M., Bell, R.M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46, 491.
- Kohler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predicted specificity. *Nature* 256, 495.
- Koretzky, G.A., Picus, J., Schultz, T., Weiss, A. (1991). Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and IL-2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2037.
- Kuba, K. (1981). Simulation of intracellular calcium oscillation in asympathetic neurone. *J. Theor. Biol.* 93, 1009.
- Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q-Y, Meissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331, 315.
- Lanzavecchia, A. (1988). Clonal sketches of the immune response. *EMBO J.* 7, 2945.
- Letourneur, F., Klausner, R. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase domain in the cytoplasmic tail of CD3. *Science* 255, 79.
- Lewis, R.S., Cahalan, M. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell Reg.* 1, 99.
- Ley, S.C., Davies, A.A., Druker, B., Crumpton, M.J. (1991). The T cell receptor/CD3 complex and CD2 stimulate the tyrosine phosphorylation of indistinguishable patterns of polypeptides in the human T leukemic cell line Jurkat. *Eur. J. Immunol.* 21, 2203.

- Li, G.C., Hahn, G.M. (1978). Ethanol-induced tolerance to heat and to adriamycin. *Nature* 274, 699.
- Lincke, C.R., van der Bliek, A.M., Schuurhuis, G.J., van der Velde-Koerts, T., Smit, J.J., Borst, P. (1990). Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human MDR1 complementary DNA. *Cancer Res.* 50, 1779.
- Ling, V. (1992). P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. *Cancer* 69, 2603.
- Litman, G.W., Rast, J.P., Shamblott, M.J., Haire, R.N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R.T., Hinds-Frey, K.R., Zilch, A., Amemiya, C.T. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 10, 60.
- Lohrmann, H.P., Graw, C., Graw, R.G. (1974). Stimulated lymphocyte cultures. *J. Exp. Med.* 139, 1037.
- Loo, T.W., Clarke, D.M. (1993). Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 3143.
- Ma, J., Fill, M., Knudson, M., Campbell, K., Coronado, R. (1988). Ryanodine receptor in skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science* 242, 99.
- MacLennan, D.H., Phillips, M.S. (1992). Malignant hyperthermia. *Science* 256, 789.
- Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M., Mikoshiba, K. (1991). Structural and functional characterization of IP3 receptor channel from the mouse cerebellum. *J. Biol. Chem.* 266, 1109.
- Malgaroli, A., Meldolesi, J. (1991). Calcium oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the IP3 formation in hepatocytes. *FEBS Letters* 283, 169.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin, E., Cazenave, P.A., Scollay, R., Malissen, B. (1992). Regulation of TCR α and β gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol. Today* 13, 315.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

- Masui, Y. (1992). Towards understanding the control of the division cycle in animals cells. *Biochem. Cell Biol.* 70, 920.
- Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, I.A. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257, 927.
- Melchers, F., Strasser, A., Bauer, S.R., Kudo, A., Thalmann, P., Rolink, A. (1989). Cellular stages and molecular steps of murine B-cell development. *Cold Spr. Harbor Symp.* 54, 183.
- Meuer, S.C., Roux, M.M., Schraven, B. (1989). The alternative pathway of T cell activation: biology, pathology, and perspectives for immunopharmacology. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 50, S133.
- Meyer, T., Stryer, L. (1991). Calcium spiking. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 153.
- Meyer, T., Stryer, L. (1988). Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5051.
- Meyer, T., Wensel, T., Stryer, L. (1990). Kinetics of calcium channel opening by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochemistry* 29, 32.
- Michalak, M., Milner, R.E., Burns, K., Opas, M. (1992). Calreticulin. *Biochem. J.* 285, 681.
- Mignery, G.A., Newton, C.L., Archer, B.T.III, Südhof, T.C. (1990). Structure and expression of the rat IP3 receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 12679.
- Mikoshiba, K. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *FEBS Letters.* 255, 289.
- Miller, J., Morahan, G. (1992). Peripheral T cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 51.
- Mills, G.B., Cheung, R.K., Cragde, E.D., Grinstein, S., Gelfand, R. (1986). Activation of the Na^+/H^+ antiport is not required for lectin-induced proliferation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 135, 1150.
- Moingeon, P.E., Lucich, J.L., Stebbins, C.C., Recny, M.A., Wallner, B.P., Koyasu, S., Reinherz, E.L. (1991). Complementary roles for CD2 and LFA-1 adhesion molecule pathways during T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 21, 605.

- Murray, A.W., Kirschner, M.W. (1991). What controls the cell cycle. *Scientific American*. Mars, 56.
- Nasheuer, H.P., Moore, A., Wahl, A.F., Wang, T.S.F. (1991). Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* 266, 7893.
- Neering, I.R., McBurney, R.N. (1984). Role for microsomal calcium storage in mammalian neurones? *Nature* 309, 158.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607.
- Norbury, C., Nurse, P. (1992). Animal cell cycle and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 441.
- Opsichuk, Y.V., Wakui, M., Yule, D.I., Gallacher, D.V., Petersen, O.H. (1990). Cytoplasmic calcium oscillations evoked by receptor stimulation, G-protein activation, internal application of inositol trisphosphate or calcium: simultaneous microfluorimetry and calcium dependent Cl^- current recording in single pancreatic acinar cells. *EMBO J.* 9, 697.
- Ostergaard, H.L., Trowbridge, I.S. (1990). Coclustering CD45 with CD4 or CD8 alters the phosphorylation and kinase activity of p56lck. *J. Exp. Med.* 172, 347.
- Otsu, K., Willard, H.F., Khanna, V.K., Zorzato, F., Green, M., MacLennan, D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 13472.
- Park, D.S., Min, H.K., Rhee, S.G. (1992). Inhibition of CD3-linked phospholipase C by phorbol ester and by cAMP is associated with decreased phosphotyrosine and increased phosphoserine contents of PLC- γ 1. *J. Biol. Chem.* 267, 1496.
- Payet, M.D., Bilodeau, L., Héroux, J., Harbec, G., Dupuis, G. (1991). Spectrofluorimetric and image recordings of spontaneous and lectin-induced cytosolic calcium oscillations in Jurkat T cells. *Cell Calcium* 12, 325.
- Peres, A. (1990). IP3 and Ca-induced Ca release in single mouse oocytes. *FEBS Letters* 275, 213.

- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346.
- Pingel, J.T., Thomas, M.L. (1989). Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell.* 58, 1055.
- Premack, B.A., Gardner, P. (1992). Signal transduction by T-cell receptors: mobilisation of Ca and regulation of Ca-dependent effector molecules. *Am. J. Physiol.* 263, C1119.
- Price, D.J., Grove, J.R., Calvo, V., Avruch, J., Bierer, B.E. (1992). Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 257, 973.
- Putney Jr, J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1.
- Rabinovitch, P.S., June, C.H., Grossman, A., Ledbetter, J.A. (1986). Heterogeneity among T cells in intracellular free calcium responses after mitogen stimulation with PHA or anti-CD3. *J. Immunol.* 137, 952.
- Randriamampita, C., Bismuth, G., Trautmann, A. (1991). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release amplifies the calcium response elicited by inositol trisphosphate in macrophages. *Cell Reg.* 2, 513.
- Rao, K.M., Currie, M.S., McCachren, S.S., Cohen, H.J. (1991). Pentoxifylline and other methyl xanthines inhibit interleukin-2 receptor expression in human lymphocytes. *Cell. Immunol.* 135, 314.
- Reed, S.I. (1992). The role of p34 kinase in the G1 to S phase transition. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8, 529.
- Rhee, S.G. (1991). Inositol phospholipid specific phospholipase C: interaction of the gamma1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem. Sci.* 16, 297.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelelak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066.
- Roberts, K., Hyams, J.S. (1979). *Microtubules*. Academic Press. New York.

- Rolink, A., Melchers, F. (1991). Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell* 66, 1081.
- Rooney, T.A., Renard, D.C., Sass, E.J., Thomas, A. (1991). Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulation. *J. Biol. Chem.* 266, 12272.
- Rooney, T.A., Sass, E.J., Thomas, A.P. (1989). Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2 loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 17131.
- Saga, Y., Furukawa, K., Rogers, P., Tung, J.-S., Parker, D., Boyse, E.A. (1990). *Biochim. Biophys. Acta.* 1095, 46.
- Samelson, L.E., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A., June, C.H. (1990). Activation of tyrosine phosphorylation in human T cells via the CD2 pathway. Regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J. Immunol.* 145, 2448.
- Schneider, U., Schwenk, H-U., Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative null and T cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621.
- Schreiber, S.L., Crabtree, G.R. (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* 13, 136.
- Seligmann, B. (1991). Monovalent ion transport and membrane potential changes during leukocyte activation. Kleinzeller, Grinstein and Rotstein (eds). *Mechanisms of leukocyte activation*. New York. Academic Press. p.104.
- Shahidul Islam, M.D., Rorsman, P., Berggren, P.-O. (1992). Calcium induced calcium release in insulin-secreting cells. *FEBS Letters* 296, 287.
- Shen, D.W., Lu, Y.G., Chin, K.V. (1991). Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit MDR unrelated to MDR1 gene expression. *J. Cell. Sci.* 98, 317.
- Sinclair, R., Bishop, H.L. (1965). Synchronous culture of strain-1 mouse cells. *Nature* 205, 1272.
- Skovsgaard, T. (1978). Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 38, 1785.
- Sorrentino, V., Volpe, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and

why? Trends Pharmacol. Sci. 14,98.

Stabel, S., Parker, P.J. (1991). Protein kinase C. Pharmac. Ther. 51, 71.

Stanton, T.H., Bomsztyk, K. (1991). Role of intracellular pH in lymphocyte activation. Kleinzeller, Grinstein and Rotstein (eds). Mechanisms of leukocyte activation. New York. Academic Press. p.207.

Stauss, D.B., Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. Cell 70, 585.

Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S., Mori, S. (1988). Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistance gene as revealed by a monoclonal antibody MRK16. Cancer Res. 48, 1926.

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kanwaga, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., Numa, S. (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature 339, 439.

Taylor, C.W., Richardson, A. (1991). Structure and function of inositol trisphosphate receptors. Pharmacol. Ther. 51, 97.

Taylor, A.C. (1966). Microtubules in the microspikes and cortical cytoplasm of isolated cells. J. Cell. Biol. 28, 155.

Taylor, C.W., Marshall, C.B. (1992). Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. Trends Pharmacol. Sci. 17,403.

Townsend, A. (1992). Antigen processing: A new presentation pathway?. Nature 356, 386.

Trowbridge, I.S. (1991). CD45 A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. J. Biol. Chem. 266, 23517.

Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J. (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocyte: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. J. Cell Biol. 94, 325.

Tsien, R.W., Tsien, R.Y. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. Annu. Rev. Cell Biol. 6, 715.

- Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J. (1982). T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 295, 68.
- Tsuruo, T. (1988). Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn. J. Cancer Res.* 79, 285.
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T., Hori, R. (1992). Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J. Biol. Chem.* 267, 24248.
- Van der Bliek, A.M., Borst, P. (1989). Multidrug resistance. *Adv. Cancer Res.* 52, 165.
- Vincent, T.S., Wülfert, E., Merler, E. (1991). Inhibition of growth factor signaling pathways by lovastatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 1284.
- Vincent, P., Graham, A.R., Young, J.W., Zbroja, R.A. (1982). Differential synchronization of leukemic cells in vivo by hydroxyurea. *Leukemia Res.* 6, 243.
- Vincentini, L.M., Villereal, M.L. (1986). Inositol phosphate turnover, cytosolic calcium and pH: putative signals for the control of cell growth. *Life Sci.* 38, 2269.
- Volpe, P., Krause, K.H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J., Lew, D.P. (1987). Calciosome, a cytoplasmic organelle: the IP_3 -sensitive calcium store of non muscle cell?. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 1091.
- Von Boehmer, H. (1992). T cell development and selection in the thymus. *Bone Marrow Transpl.* 9, 46.
- Wahl, M., Gruenstein, E. (1993). Intracellular free calcium in the cell cycle in human fibroblasts: Transitions between G1 and G0 and progression into S phase. *Mol. Biol. Cell.* 4, 293.
- Wakui, M., Potter, B.V.L., Petersen, O.H. (1989). Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentrations. *Nature* 339, 317.
- Wang, C.-Y., Petryniak, B., Thompson, C.B., Kaelin, W.G., Leiden, J.M. (1993). Regulation of the Ets-related transcription factor Elf-1 by binding

to the retinoblastoma protein. *Science* 260, 1330.

- Weaver, C.T., Pingel, J.T., Nelson, J.O., Thomas, M.L. (1991). CD8+ T-cell clones deficient in the expression of the CD45 protein tyrosine phosphatase have impaired responses to T-cell receptor stimuli. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4415.
- Whitney, R.B., Sutherland, R.M. (1972). Enhanced uptake of calcium by transforming lymphocytes. *Cell. Immunol.* 5, 137.
- Willingham, M.C., Cornwell, M.M., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1986). Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells: Effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res.* 46, 5941.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L. (1992). The Ca^{2+} -transport ATPases from the plasma membrane. *J. Bioener. Biomembr.* 24, 285.
- Yamada, A., Steuli, M., Saito, H., Rothstein, D.M., Schlossman, S.F., Morimoto, C. (1990). Effects of activation of protein kinase C on CD45 isoform expression and CD45 protein tyrosine phosphatase activity in T cells. *Eur. J. Immunol.* 20, 1655.
- Yamada, A., Streuli, M., Saito, H., Rothstein, D.M., Schlossman, S.F., Chikao, M. (1990). Effect of activation of protein kinase C on CD45 isoform expression and CD45 protein tyrosine phosphatase activity in T cells. *Eur. J. Immunol.* 20, 1655.
- Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N.M., Lai, F.A., Meissner, G., MacLennan, D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 2244.

PAGINATION ERROR.

TEXT COMPLETE.

ERREUR DE PAGINATION.

LE TEXTE EST COMPLET.

NATIONAL LIBRARY OF CANADA.

CANADIAN THESES SERVICE.

BIBLIOTHEQUE NATIONALE DU CANADA.

SERVICE DES THESES CANADIENNES.

Coloration à l'argent (Dr. Eliane Muller)

1. Fixation

Solution: 50% éthanol + 10% acide acétique. Chauffer la solution pendant 2 minutes au four à micro-ondes. Tremper le gel dans la solution chaude pendant 5 minutes.

2. Traitement à la formaldéhyde (1 minute) (300ml)

Préparer une solution fraîche de formaldéhyde à 0.025% et de thiosulfate de sodium $86.5\mu\text{M}$, c'est-à-dire $200\mu\text{l}$ de formaldéhyde, $150\mu\text{l}$ de solution de thiosulfate de sodium stock et diluer à 300ml avec de l'eau déionisée.

Solution stock de thiosulfate de sodium (173mM): 43g/l.

3. Rinçage

Rincer le gel 3 fois pendant 1 minute avec de l'eau déionisée.

4. Coloration

Préparer une solution fraîche de AgNO_3 (11.8mM, 2g/l) dans 0.025% de formaldéhyde et laisser tremper le gel pendant 30 minutes sous faible agitation.

5. Rinçage

Répéter l'étape 3

6. Réduction

Placer le gel dans une solution de Na_2CO_3 (600mM, 60g/l), 0.018% de formaldéhyde et $1.73\mu\text{M}$ de thiosulfate de sodium, c'est-à-dire $150\mu\text{l}$ de formaldéhyde, $3\mu\text{l}$ de la solution stock de thiosulfate de sodium dilués à 300ml.

Temps: 10 minutes - 2 heures.

7. Rinçage

Répéter l'étape 3

8. Arrêt

Solution de 7% d'acide acétique pendant 10 minutes.

9. Traitement au glycérol pour le séchage

Solution de 5% glycérol + 10% d'acide acétique. Laisser temper pendant 1 heure.